

THESIS

LIEGE

1968

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE

**Contribution à l'étude des caractères cytologiques
et biologiques des mastocytes normaux du rat**

PAR

Edgard BAECKELAND

Conservateur à l'Institut d'Histologie et d'Embryologie

1968

THÈSES ANNEXES

1. Des acides désoxyribonucléiques peuvent être mis en évidence dans les chondriosomes modifiés de fibroblastes cultivés *in vitro* en présence de trihydroxy-N-méthylindole.
(Recherches personnelles.)
2. Le myleran est capable de produire, dans des fibroblastes normaux cultivés *in vitro*, d'importantes modifications de la taille et de la teneur en acides désoxyribonucléiques des noyaux.
(Recherches personnelles.)
3. La technique histoautoradiographique à base d'uridine tritiée permet de démontrer une synthèse rapide et intense d'acides ribonucléiques dans les noyaux de fibroblastes de poulet cultivés *in vitro*.
(Recherches personnelles.)

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE

**Contribution à l'étude des caractères cytologiques
et biologiques des mastocytes normaux du rat**

PAR

Edgard BAECKELAND

Conservateur à l'Institut d'Histologie et d'Embryologie

1968

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le présent mémoire peut être livré à l'impression.

Liège, le 22 octobre 1968.

Le Secrétaire de la Faculté,
(s) G. LEROUX

Le Doyen
de la Faculté de Médecine,
(s) M. WELSCH

Le Secrétaire du Jury,
(s) J. FREDERIC

Article 6 de l'arrêté royal du 10 mars 1931 appliquant la loi du 21 mai 1929 sur la collation des grades académiques et le programme des examens universitaires :

« En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées, par le fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme étant celles du Jury ou de l'Université. »

A mon père
Bruno BAECKELAND
1894 - 1963



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153502_0056

Le Professeur Chèvremont fut notre guide au cours de toute notre carrière. Durant la réalisation de notre mémoire, il nous a particulièrement manifesté sa bienveillance en ne cessant de nous prodiguer de précieux conseils et de nombreux encouragements. Nous voulons lui lémoigner ici, notre très vive reconnaissance et nous serions heureux si notre travail venait à représenter un reflet de ce que nous lui devons dans notre formation scientifique. Nous remercions également Madame Chèvremont pour l'intérêt avec lequel elle a suivi nos recherches.

Notre profonde gratitude va aussi au Professeur Lecomte qui ne nous a ménagé ni son temps ni ses peines pour nous faire bénéficier de sa grande compétence et de son expérience considérable de la physiopathologie des amines biogènes.

Grâce aux facilités et aux conseils judicieux que nous avons reçus du Professeur Gerebtzoff, nous avons pu aborder avec fruit les questions liées à la microscopie en UV. Qu'il en soit chaleureusement remercié.

Enfin, ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide efficace des membres du personnel technique du Service d'Histologie. Que chacun d'entre eux soit persuadé que nous lui savons gré de sa collaboration dévouée.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	13
MATÉRIEL ET TECHNIQUES	18
RECHERCHES PERSONNELLES	25
CHAPITRE I : CARACTÈRES CYTOLOGIQUES DES MASTOCYTES DE RAT ...	25
1. <i>Description</i>	26
A. Les mastocytes vivants	26
a) Les mastocytes péritonéaux	26
b) Colorations supra-vitales	33
B. Les mastocytes dans les préparations fixées.....	34
2. <i>Cytophysiologie</i>	35
A. Capacité d'athrocyter	35
B. Motilité et tactisme	36
C. Capacité de multiplication	38
a) Dosages cytophotométriques d'ADN après réaction de Feulgen	38
b) Etude histautoradiographique à base de thymidine tritiée.....	40
3. <i>Cytochimie</i>	41
A. Etude des mucopolysaccharides sulfatés	42
a) Mise en évidence par des réactions électives des mucopolysaccharides acides	42
b) Groupements vic-glycols et structures Schiff positives..	47
c) Etude de préparations histautoradiographiques provenant d'animaux injectés de sulfate radioactif ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$)	49
B. Etude des amines biogènes	53
a) Mise en évidence d'une fluorescence en U V des mastocytes de rat fixés aux vapeurs de paraformaldéhyde.....	54
b) Réaction de couplage avec les sels de diazonium.....	56
C. Recherche des lipides	57
D. Mise en évidence de groupements aldéhydiques libres et de certains caractères réducteurs	59
4. <i>Distribution des mastocytes dans les tissus et organes du rat</i>	63
<i>Discussion du chapitre I</i>	70
<i>Résumé du chapitre I</i>	85
CHAPITRE II : ACTION DES AMINO-LIBÉRATEURS ET DE LA RÉSERPINE SUR LES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX	88
1. <i>Description des effets cellulaires des amino-libérateurs</i>	91
A. Le 48/80	91
B. Le 1935 L	94

	Pages
C. Le polybrène	95
D. Les dextrans	97
E. Les milieux hypotoniques	98
F. Le sérum sanguin	101
G. La réserpine	102
2. <i>Etude cytochimique des mastocytes traités</i>	103
A. Les mucopolysaccharides acides	103
B. Coloration par le réactif de Schiff	106
C. Les lipides	106
D. Les amines biogènes	106
3. <i>Dosages biologiques d'histamine dans les préparations traitées par des amino-libérateurs</i>	109
A. Le polybrène	109
B. Le sérum frais	113
C. Le dextran	116
<i>Discussion du chapitre II</i>	117
<i>Résumé du chapitre II</i>	125
CHAPITRE III : ETUDE DES MASTOCYTES NORMAUX DE RAT CULTIVÉS <i>in vitro</i> ET DES CONDITIONS NÉCESSAIRES A LEUR SURVIE	127
1. <i>Méthodes et milieu de culture « habituels »</i>	129
A. Cultures « en goutte pendante » (mésentère)	130
B. Cultures en tubes roulants (mésentère)	130
a) Tissus prélevés au niveau des axes vasculaires	130
b) Tissus prélevés entre les axes vasculaires	133
C. Cultures de cellules péritonéales en flacons de Carrel	134
D. Cultures de cellules péritonéales en tubes roulants	136
E. Autres techniques de culture	136
2. <i>Etude de la dégranulation des mastocytes lors de la mise en culture. Action d'un facteur sérique thermolabile</i>	139
A. Moyens de supprimer l'activité dégranulante du sérum	140
B. Origine du facteur dégranulant	141
C. Inhibition de la dégranulation par les ions sulfate	143
3. <i>Recherche des facteurs favorables à la survie prolongée des mastocytes. Essai de mise au point d'une technique de culture</i>	145
A. Existence dans le liquide péritonéal de substances favorables à la survie des mastocytes	145
a) Survie des mastocytes en présence de liquide péritonéal	145
b) Survie des mastocytes en l'absence de liquide péritonéal	145
B. Culture de mastocytes péritonéaux en présence de sérum	146
a) Première méthode	149
b) Seconde méthode	153

	Pages
C. Recherches en vue d'améliorer nos conditions de culture ...	156
4. <i>Quelques observations portant sur les mastocytes cultivés in vitro</i> .	163
A. Morphologie et cytochimie des mastocytes péritonéaux	163
B. Cytophysiologie.....	165
a) Phagocytose et athrocytose	165
b) Mouvements et motilité	165
C. Recherche d'une néoformation éventuelle de mastocytes ...	166
D. Traitement des mastocytes par un amino-libérateur, le 48/80	167
<i>Discussion du chapitre III</i>	168
<i>Résumé du chapitre III</i>	175
CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES	177
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	187
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	195

INTRODUCTION

La découverte des mastocytes remonte à près de cent ans. C'est en effet en 1878 qu'EHRlich publia sa thèse où, pour la première fois, ces cellules furent reconnues comme des éléments particuliers du tissu conjonctif. Depuis lors, de très nombreuses études leur ont été consacrées; on est cependant surpris de constater les importantes lacunes qui grèvent encore nos connaissances à leur sujet.

Sans parler des fréquentes contradictions qui se sont manifestées dans la littérature et que nous aurons l'occasion de relever au cours de ce travail, deux questions essentielles pour l'étude des mastocytes n'ont reçu qu'une réponse fort partielle : aucune définition complètement satisfaisante de cet élément n'a pu encore être fournie et sa fonction normale dans l'organisme fait toujours l'objet de spéculations.

Qu'est-ce qu'un mastocyte ? Depuis qu'EHRlich (1879) a défini le mastocyte comme étant une cellule conjonctive possédant des granules se colorant métachromatiquement par certains colorants basiques, on peut dire que cette notion n'a pas été autrement précisée. Dans sa monographie publiée en 1965, SELYE s'exprime ainsi : « A mast cell is a connective tissue element which possesses cytoplasmic granules that stain metachromatically under ordinary conditions. » Que signifient les mots : « dans des conditions ordinaires » ? Le caractère vague et imprécis de cette expression cache un embarras certain que l'auteur ne dissimule d'ailleurs pas. En réalité, la présence de substance chromotrope dans les granules mastocytaires est la *seule* caractéristique qui, jusqu'à présent, permette d'identifier ces cellules au microscope, chez tous les animaux et dans tous les organes. Or, on sait que dans différentes circonstances, expérimentales ou pathologiques, certaines cellules conjonctives peuvent posséder des inclusions cytoplasmiques présentant une coloration métachromatique (phagocytose de différents matériaux, développement intracellulaire de particules virales, etc...). Différents auteurs (BENSLEY, 1952; BURTON, 1963) se sont d'ailleurs demandé si, dans des conditions normales, les

mastocytes ne pourraient pas se différencier à partir d'autres cellules conjonctives en absorbant et en concentrant dans leur cytoplasme des mucopolysaccharides présents dans la substance fondamentale conjonctive. Bref, on ne sait pas si on doit considérer les mastocytes comme une catégorie particulière de cellules ou s'ils représentent un des états particuliers que pourraient prendre certaines cellules conjonctives.

Quant à la fonction normalement exercée dans l'organisme par les mastocytes, on peut affirmer que, jusqu'à présent, elle reste inconnue. Les théories les plus diverses ont été proposées : ils participeraient à la défense contre la cancérisation et à certaines réactions immunologiques, en particulier anaphylactiques; ils interviendraient dans le métabolisme des lipides, l'activité nerveuse ou la «détoxication» de l'organisme; ils élaboreraient des éléments constitutifs de la substance fondamentale conjonctive comme l'acide hyaluronique et même des fibres élastiques. Aucune de ces théories ne repose sur des bases solides. Aucune preuve formelle de la réalité de l'une ou de l'autre de celles-ci n'a jamais été apportée. Doit-on considérer les modifications morphologiques observées au niveau des mastocytes sous l'influence de certains agents pharmacodynamiques, tels que les libérateurs d'amines, comme la manifestation de leur fonction normale, éventuellement exagérée ? Rien ne nous y autorise *a priori*.

Il ne faudrait cependant pas croire que le bilan des nombreuses recherches qui ont été consacrées aux mastocytes pendant près d'un siècle soit totalement négatif. Des faits importants ont été établis. Les mastocytes semblent exister chez tous les Mammifères et même chez tous les Vertébrés. Leur nombre peut augmenter dans certaines circonstances pathologiques, comme UNNA l'a signalé dès 1894 pour les lésions cutanées d'urticaire pigmentaire. On a reconnu également que le mucopolysaccharide sulfaté présent dans les granules mastocytaires et responsable de leur métachromasie est l'héparine (JORGES, 1937). Ils sont riches en amines et, en particulier, en histamine (RILEY, 1953). La 5-hydroxytryptamine a été mise en évidence dans les mastocytes de rat et de souris (BENDITT et coll., 1955).

En fait, c'est la découverte de quantités importantes d'amines biogènes dans les mastocytes qui a renouvelé l'intérêt des chercheurs pour ces cellules; la connaissance des conditions bien

particulières dans lesquelles ces amines sont libérées a permis de provoquer des lésions mastocytaires dans un grand nombre de circonstances. Cependant, dans la plupart des cas, les recherches ont surtout porté sur le mécanisme du déclenchement de ces lésions plutôt que sur l'étude de ces lésions elles-mêmes. En outre, rien n'indique que ce qui se produit dans ces conditions expérimentales corresponde nécessairement au rôle joué normalement par les mastocytes.

Comment expliquer que nous possédions relativement peu d'informations sur les mastocytes ? Cela tient à plusieurs raisons qui sont en rapport, le plus souvent, avec la grande dispersion de ces cellules dans les tissus conjonctifs, de sorte que, sauf cas exceptionnel, il est malaisé de les soumettre à une analyse biochimique sûre. Par ailleurs, leur culture *in vitro* — du moins en ce qui concerne les mastocytes normaux, non tumoraux — n'a pu encore être réalisée, d'où de grandes difficultés pour mettre en évidence leurs principales propriétés biologiques.

* * *

Dans ce mémoire, nous nous proposons de rechercher ce qui caractérise le mastocyte de rat des points de vue cytologique, cytophysiologique et cytochimique. Nous tenterons également de mettre en évidence leurs principales propriétés biologiques. Nous chercherons d'une part à préciser le concept du mastocyte et d'autre part à connaître ses fonctions normales. Ces problèmes seront aussi abordés d'une autre manière : des tentatives de culture de mastocytes *in vitro* seront rapportées. Cette technique, qui s'est révélée si féconde dans de nombreux autres domaines, pourrait ici aussi apporter de précieuses informations. Jusqu'à présent cependant on n'est pas parvenu à maintenir en vie les mastocytes normaux de rat dans des cultures faites selon les méthodes habituelles. La nature des difficultés que l'on rencontre n'a encore jamais été précisée et les rares essais rapportés dans la littérature (voir notamment BURTON, 1959 et 1960) montrent que les mastocytes dégénèrent rapidement. Il est évident que ces cellules ne survivront, *in vitro*, que si nous parvenons à réaliser des conditions de vie aussi proches que possible de celles qui règnent *in vivo* dans les sites où elles se localisent. La connaissance du milieu le plus favorable aux mastocytes est

essentielle car celui-ci est, vraisemblablement, dans une certaine mesure en rapport avec le rôle qu'ils jouent dans l'organisme ainsi qu'avec leurs métabolismes particuliers. Par ailleurs, on peut considérer que la mise au point éventuelle d'une technique de culture des mastocytes serait de grande valeur pour l'expérimentation ultérieure : les possibilités de contrôle strict des conditions de culture ainsi que les facilités d'observation directe de mastocytes vivants constituent des perspectives particulièrement séduisantes. Aussi nous sommes-nous engagé dans ces recherches et avons-nous persévéré malgré de nombreux échecs.

Par ailleurs, on peut noter des différences entre les mastocytes des diverses espèces animales. Non seulement leur morphologie peut être variée mais il semble également que même des constituants essentiels et caractéristiques des mastocytes puissent présenter une certaine variabilité. C'est ainsi que la substance responsable du phénomène de métachromasie au niveau des granules paraît être plus difficile à insolubiliser au moment de la fixation lorsqu'on s'adresse à des tissus de lapin plutôt qu'à ceux de rat. Si on recherche les mastocytes dans les tissus de lapin fixés dans une solution aqueuse, il est presque impossible de les mettre en évidence. Il faut aussi remarquer, comme nous venons de le rapporter, que les amines peuvent être de nature différente selon l'animal. Bref, certaines données cytochimiques valables pour une espèce animale, ne le sont pas nécessairement pour d'autres.

De plus, si l'apparition des mastocytes chez l'embryon est plus ou moins précoce selon les différentes espèces, il est fréquent de constater qu'à la naissance, ces cellules sont peu nombreuses (WEBB, 1935) et ne sont pas « mûres » ou tout au moins ne possèdent pas un très grand nombre de granules cytoplasmiques. BATES (1935), entre autres, a montré que chez le rat les mastocytes ne possèdent une charge complète en granules que plusieurs semaines après la naissance.

En conséquence, il serait vain d'envisager d'emblée une étude portant sur des mastocytes provenant d'animaux d'espèces différentes et d'âges différents. Il nous a paru préférable de faire porter nos recherches uniquement sur les mastocytes de rats âgés de 2 à 3 mois. Dans ces conditions en effet, ces cellules sont relativement volumineuses, elles sont assez nombreuses

dans certains tissus et leur mise en évidence ainsi que leur identification sont aisées; en outre, comme nous le verrons, le rat comme la souris offre la possibilité d'obtenir, par lavage de la cavité péritonéale, des mastocytes qui se trouvent en suspension dans un milieu liquide; ce dernier matériel est particulièrement précieux pour les examens cytologiques à fort grossissement.

S'il est essentiel de rechercher la fonction normale remplie par les mastocytes dans l'organisme, il n'en reste pas moins que d'autres problèmes très importants en ce qui les concerne ne sont pas résolus. Existe-t-il une néoformation de mastocytes par différenciation à partir d'autres cellules conjonctives? Peuvent-ils se multiplier? Quels sont leurs rapports avec le métabolisme des amines, etc...? Aussi aborderons-nous, dans le cadre de ce travail, diverses autres questions en rapport avec ces cellules de façon à tenter de clarifier, dans la mesure de nos moyens, des conceptions trop souvent contradictoires.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Toutes nos recherches ont été effectuées sur des rats albinos âgés de 2 à 3 mois et pesant de 135 à 260 g. Sur ces animaux nous avons prélevé soit des cellules libres, soit des membranes, telles que le périoste ou le mésentère, soit encore des fragments d'organes. Ces prélèvements ont été utilisés pour étudier les mastocytes ou vivants ou après fixation.

A. — PRÉLÈVEMENT EN VUE DE L'OBSERVATION DE MASTOCYTES VIVANTS ET DE LEUR CULTURE

a) *Récolle de cellules péritonéales libres.*

L'animal est d'abord assommé et saigné à blanc; nous injectons ensuite dans la cavité abdominale 10 ml d'une solution saline, le plus souvent du « liquide G » (PUCK et coll., 1958) ⁽¹⁾. Après incision de la paroi abdominale, le liquide est rapidement aspiré à la pipette.

Pour un certain nombre de nos expériences de culture et afin d'accroître le nombre de mastocytes présents dans les prélèvements, les animaux ont reçu par voie intraveineuse soit de l'héparine (à la dose de 2 mg par 100 g de poids corporel) soit du sulfate de soude (à la dose de 2,4 mg par 100 g de poids corporel), 15 à 30 minutes avant le sacrifice.

⁽¹⁾ Composition du « liquide G » de PUCK et collaborateurs

NaCl	7,5 g
KCl	0,4 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,154 g
CaCl ₂	0,016 g
Na ₂ HPO ₄	0,525 g
KH ₂ PO ₄	0,150 g
Glucose	1,1 g
Rouge phénol (solution à 0,2 %) :	5 ml
Eau distillée pour faire 1 litre.	

En 1964, nous avons été amené à rechercher les conditions les meilleures pour mettre en culture des cellules péritonéales. Comme certains chercheurs (UVNÄS et THON, 1959; KELLER et OPPLIGER, 1961) avaient ajouté de l'héparine à des prélèvements de cellules péritonéales, en vue notamment de maintenir la dispersion de ces éléments en suspension, nous avons entrepris une série d'essais avec ce mucopolysaccharide pour déterminer si son emploi était avantageux dans le but que nous nous étions fixé. Dès les premières expériences, nous avons rejeté l'emploi de l'héparine; en effet lorsqu'elle est ajoutée au liquide de prélèvement à la concentration de 1 mg/ml, elle provoque fréquemment des hémorragies intrapéritonéales. Nous avons alors procédé à une héparinisation préalable de nos animaux par injection intraveineuse. Dans ces conditions et pour des doses judicieusement choisies, nous avons constaté une augmentation du nombre de mastocytes présents dans le liquide de lavage de la cavité péritonéale (BAECKELAND, 1965a). Etant donné que les autres éléments figurés ne sont pas plus nombreux par unité de volume, on peut dire qu'il s'agit d'un véritable enrichissement du prélèvement en mastocytes. C'est ainsi que si on injecte 2 mg d'héparine (Liquémine Roche) par 100 g de poids corporel 15 à 30 minutes avant le sacrifice, le pourcentage des mastocytes atteint environ 10 %, alors que, normalement, il est compris entre 2 et 6 %.

Comme d'une part nous avons constaté l'influence bienfaisante des ions sulfate sur le maintien en vie *in vitro* des mastocytes (BAECKELAND, 1964) et que d'autre part l'effet de l'héparine pouvait résulter de sa destruction avec enrichissement consécutif du milieu intérieur de l'animal en ions sulfate, nous avons injecté, également par voie intraveineuse, une solution de sulfate de soude avant le sacrifice. A la dose relativement élevée de 2,4 mg par 100 g de poids corporel, nous avons obtenu un effet analogue à celui de l'héparine en ce qui concerne l'augmentation du nombre de mastocytes dans le prélèvement. La compréhension du mécanisme d'action de l'héparine et du sulfate de soude nous échappe encore actuellement.

b) Prélèvement de mésentère pour culture.

Après ouverture de la cavité péritonéale du rat saigné à blanc, nous isolons un large fragment de mésentère par dissection aux ciseaux. Ce fragment est transféré sur une lame creuse et recouvert d'un peu de liquide de Tyrode-glycosol. Ensuite, avec de petits scalpels à iridectomie, des explants d'environ 1,5 mm de côté sont généralement découpés près des vaisseaux, là où le mésentère est plus épais (axes vasculaires). Toutes ces manipulations préalables à la mise en culture doivent se faire avec délicatesse et célérité de façon à éviter les effusions de sang et la dessiccation.

B. — TECHNIQUES PARTICULIÈRES
EN VUE D'UN EXAMEN APRÈS FIXATION

a) *Périoste étalé* (matériel très favorable à la démonstration des mastocytes).

Celui-ci a été prélevé à la face interne du crâne et traité selon la technique de SELYE et coll. (1963).

b) *Mésentère étalé*.

Après résection d'une anse intestinale avec son mésentère, ce dernier est étalé sur une lame porte-objet ou sur une lamelle couvre-objet. Après dessèchement à la température du laboratoire, les axes vasculaires du mésentère et l'intestin sont disséqués et éliminés aisément de la préparation.

C. — FIXATION

Sauf en ce qui concerne les recherches histochimiques, la plupart de nos prélèvements ont été fixés dans un mélange fixateur à base d'acétate basique de plomb (formaline neutralisée : 10 ml; alcool éthylique à 95 vol. % : 60 ml; acétate basique de plomb, solution à 25 % : 20 ml; eau distillée *quantum salis* pour faire 100 ml). Dans certains cas, nous avons cependant eu recours au liquide fixateur de Carnoy, à celui de Susa ou à l'alcool éthylique à 80 vol. %. Au cours de notre travail, il s'est avéré utile de laver nos prélèvements par une solution isotonique enrichie en ions sulfate avant de les plonger dans le liquide fixateur. Dans ces conditions, on peut éviter dans une large mesure les artefacts qui se produisent parfois au niveau des mastocytes lorsqu'on omet ce traitement. En particulier, on n'observe plus d'images aberrantes de dégranulation.

D. — COLORATION

Différentes techniques ont été utilisées. Le bleu de toluidine (en solution aqueuse à 0,2 %, avec éventuellement différenciation rapide à l'eau acétifiée) permet de mettre aisément en évidence les mastocytes. Après cette coloration, on distingue cepen-

dant difficilement les structures de ces cellules et en particulier leur noyau, en raison de la densité de la substance chromotrope. C'est pourquoi nous avons en général préféré une technique dérivée de celle préconisée par ORLANDI (1961) pour les mastocytes humains. Elle consiste en une coloration par le bleu alcian suivie d'une contre-coloration nucléaire au Kernechtrot. Pour notre part, nous avons procédé de la façon suivante : bleu alcian 8 GS spécial à 0,05 % dans une solution sulfurique (H_2SO_4 concentré dilué à 10 %) additionnée de Mg Cl_2 (0,2 M en concentration finale) selon les conseils de SCOTT et DORLING (1965) (15 minutes); puis Kernechtrot à 1 % dans une solution aqueuse à 5 % de AlCl_3 (5 minutes). En outre, nous avons également eu recours aux deux techniques de coloration recommandées par ALLEN (1960) : 1. réaction de Feulgen suivie d'une coloration par le vert de méthyle en solution alcoolique; 2. mise en évidence des noyaux par l'hématoxyline de Carazzi suivie d'une coloration des granules mastocytaires par le rouge neutre en solution alcoolique.

E. — OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

Les examens des mastocytes sur le vivant et à fort grossissement ont été effectués en lumière ordinaire et en contraste de phase au microscope binoculaire de Wild en utilisant des oculaires $10\times$ et des objectifs Wild Fluotar HI 100 Ph et Wild Fluotar HI 100. Pour certaines expériences réalisées à 37°C , nous avons monté sur la platine une chambre thermostatique de la même marque Wild. L'observation des mastocytes en contraste interférentiel a été faite au microscope Nachet 300 (oculaire $10\times$ et objectif $100\times$ plan).

Quant aux cultures en flacon de Carrel, nous les avons examinées sur le vivant en lumière ordinaire au microscope inversé binoculaire Zeiss, le plus souvent avec un objectif Neofluar 25/0,50 et des oculaires Kpl $8\times$.

F. - CULTURE DE TISSUS ET DE CELLULES

Les *fragments de mésentère* ont été cultivés *in vitro* soit en goutte pendante, soit en tubes roulants (roller-tubes). Dans ce dernier cas, la mise en place sur la paroi du tube se fait avec

du plasma entier de poulet. Le milieu liquide est constitué généralement par de l'extrait embryonnaire de poulet (10 %), par du sérum de cheval (10 %) préalablement chauffé à 56 °C pendant 3 heures et par du liquide de Tyrode-glycosol ou de Hanks; on ajoute 100 unités de pénicilline par ml. Renouvellement du milieu liquide tous les 2 ou 3 jours et repiquage dans d'autres tubes après une dizaine de jours. Un certain nombre de cultures ont été faites sur lamelles. Ces dernières ont été ensuite introduites dans des tubes de Leighton. Après culture, elles ont été fixées et colorées généralement au bleu de toluidine.

Quant à la culture des cellules péritonéales, elle a été réalisée soit en flacons de Carrel (modèle D 3,5) soit en flacons T de Earle. Dans ces derniers, nous avons généralement placé une lamelle qui peut être retirée et fixée après différents délais. A partir d'un prélèvement fait sur un animal, nous avons réalisé 3 ou le plus souvent 4 cultures en flacons Carrel, ou 3 cultures en flacons T. La quantité de milieu liquide généralement utilisée était de 2 ml; au départ, on pouvait dénombrer dans nos cultures 2 à 3 millions de cellules par ml.

Dans certains cas, nous avons dû réaliser des subcultures et transplanter les cellules dans d'autres flacons de culture. Après lavage par une solution isotonique dépourvue de calcium et de magnésium, les cellules ont été libérées par « trypsinisation ». Nous avons fait agir de la trypsine de marque « Difco » à la concentration de 0,05 % pendant 10 à 15 minutes à 37 °C. Ensuite, transfert des cellules dans d'autres flacons à raison de 200 000 cellules par flacon Carrel et de 300 000 cellules par flacon T.

Les différents milieux utilisés seront décrits au cours de l'exposé. Sont entrés dans leur constitution, seul ou en mélange, des solutions salines isotoniques (liquide de Hanks, liquide F selon Puck et coll. (1958), liquide de Earle), du sérum, de l'extrait embryonnaire de poulet, du plasma humain ou de coq (généralement hépariné) et des liquides nutritifs chimiquement définis comme les milieux 199 et NCTC 109 de « Difco ». Dans certaines expériences, nous avons employé une solution saline à base de sulfate de soude que nous appelons « solution S » et dont voici la composition :

$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$	55,8 g
Glucose	1,0 g
KCl	0,4 g
Na_2HPO_4	0,06 g
KH_2PO_4	0,06 g
CaCl_2	0,14 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g
Rouge phénol (solution à 0,2 %)	5 ml
Eau distillée pour faire un litre.	

Diverses substances ont été ajoutées à ces milieux : acide chondroïtine-sulfurique (de la firme Sigma, sous la forme d'un sel sodique), acide hyaluronique (soit une préparation RO 1-7065 de la S.A. F. Hoffman-Laroche, soit une préparation d'origine humaine de la Chemische Fabrik — Buchs A. G.), héparine (Liquémine « Roche »), dextran, d'un poids moléculaire moyen de 75 000 (Christiaens — Bruxelles, Batch n° AY), polyvinylpyrrolidone d'un poids moléculaire moyen de 40 000 (Specia — Paris), sérumalbumine bovine (Mann Research Laboratories), fibrinogène bovin Fr. I (Nutritional Biochemicals Co, Cleveland, U. S. A.).

En raison des relations qui, comme nous le verrons, existent entre le sérum et les mastocytes, nous décrirons, ici, en détails la préparation de ce dernier. A l'abattoir, le sang est recueilli, immédiatement après le sacrifice, à la veine jugulaire, chez des veaux d'un an, assommés puis égorgés. Après transfert au laboratoire, on laisse le caillot sanguin se rétracter à la température de 37 °C pendant 8 heures. Le liquide exsudé est alors centrifugé à $1\,650 \times g$ (centrifugeuse MSE — modèle P) afin d'éliminer les globules rouges. Le sérum obtenu est ensuite stocké au réfrigérateur à 4 °C jusqu'au lendemain. Il est ensuite passé sur filtre millipore et réparti dans de petits flacons en quantités de 10 à 20 ml. Ces flacons sont conservés au « deep-freezer » à —20 °C jusqu'à utilisation ⁽¹⁾.

(1) Pour vérifier la stérilité bactériologique de chaque lot, il suffit d'en laisser un échantillon pendant 3 jours à l'étuve à 37 °C et de l'examiner après ce délai.

G. — HISTO AUTORADIOGRAPHIE

a) A base de thymidine tritiée (Amersham TRA 120 Batch 16 — activité spécifique 1,7 c/mM) injectée sous forme de solution par voie intraveineuse à raison de 15 μ c par gramme d'animal.

b) A base de Na₂ ³⁵SO₄ (Amersham n° 421248/5) injecté par voie intraveineuse à raison de 10 μ c par gramme d'animal.

Dans les deux cas, nous avons procédé selon la méthode de DONIACH et PELC (1952), avec du stripping-film Kodak AR 10. Temps de pose : généralement 10 jours pour le matériel tritié, de 1 à 3 mois pour détecter le soufre radioactif. Développement : révélateur Kodak D 19b dilué de moitié (5 minutes), lavage à l'eau (30 secondes), solution d'hyposulfite de soude à 240 g par litre (3 minutes). Après séchage de la préparation, tannage du film par une solution de formol à 10 %. Coloration au bleu de toluidine ou au bleu alcian — Kernechtrot (voir plus haut). En raison de certaines difficultés de pénétration du bleu alcian à travers le stripping-film, nous avons parfois réalisé cette coloration préalablement à la pose de ce dernier.

* * *

Les autres techniques cytochimiques seront décrites au cours de l'exposé.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

CARACTÈRES CYTOLOGIQUES DES MASTOCYTES DE RAT

On admet généralement que les mastocytes constituent une catégorie homogène de cellules bien individualisées. Cependant, cette opinion est loin d'être unanime.

C'est ainsi que certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'il existerait différents types de mastocytes. Pour VELICAN et VELICAN (1963), les mastocytes présents dans un même organe différencieraient les uns des autres par la nature de leurs mucopolysaccharides. ASBOE-HANSEN (1963) semble être également de cet avis. D'autres chercheurs ont décrit une certaine hétérogénéité de la population mastocytaire sur la base de colorations histologiques ou de réactions histochimiques. Pour RILEY (1953) il existerait deux types de mastocytes : les granules des uns prendraient une teinte orthochromatique après coloration au bleu de toluidine, les granules des autres une teinte métachromatique.

Lorsqu'on traite des préparations par deux colorants qui permettent chacun séparément de mettre en évidence les mastocytes, il serait possible également d'en distinguer deux catégories sur la base de l'affinité prédominante de leurs granules pour l'un ou l'autre de ces colorants; il en serait ainsi avec le bleu alcian et le crésyl-violet selon JASMIN et Bors (1961) et avec le bleu alcian et la safranine selon SPICER (1960). D'autres encore comme BURTON (1963) pensent que les mastocytes ne constitueraient pas une lignée indépendante mais correspondraient à un état cellulaire particulier qui devrait être rapproché de celui des cellules histiocytaires, l'état histiocytaire (CHÈVREMENT, 1942, 1956).

Ces quelques exemples témoignent de la grande confusion qui règne à propos des mastocytes. Si nous ajoutons que les différentes conceptions développées au sujet des mastocytes sont le plus souvent contradictoires, on comprendra que, dans l'état actuel de nos connaissances, une étude systématique du mastocyte, par les différentes techniques qui sont à notre disposition, est non seulement souhaitable, mais indispensable.

Avant d'aborder tout autre problème, il importe donc de rechercher les caractéristiques essentielles des mastocytes de rat et d'en faire une étude aussi large que possible. A côté de leurs caractères morphologiques et cytochimiques, il faut préciser leur cytophysiologie.

1. — DESCRIPTION

A. — LES MASTOCYTES VIVANTS

Différentes techniques permettent d'observer des mastocytes vivants. Certaines d'entre elles consistent à examiner ces cellulès à des endroits favorables chez l'animal en vie (PAFF et MERGENTHALER, 1955; BURTON et BENSLEY, 1958). On peut également utiliser des organes maintenus en survie pendant des laps de temps relativement courts, le mésentère par exemple (SYLVÉN, 1950; DOUGHERTY et SCHNEEBELI, 1958; SMITH et coll., 1960; etc...). Généralement, ces techniques ne permettent pas d'effectuer des examens microscopiques à fort grossissement. De plus, la présence d'autres structures tissulaires, comme les fibres conjonctives qui souvent se superposent aux mastocytes, perturbe les observations. Par contre, les liquides péritonéaux de certains petits animaux de laboratoire comme le rat et la souris, constituent un matériel de choix pour l'étude des mastocytes (FELIX et DALTON, 1955; PADAWER et GORDON, 1956) (Voir *Matériel et Techniques*). En récoltant par lavage les cellules présentes dans les deux grandes cavités séreuses, on peut en effet obtenir une suspension de cellules libres où les mastocytes sont particulièrement nombreux surtout si l'animal a reçu, par voie intraveineuse, de l'héparine (BAECKELAND, 1965a) ou du sulfate de soude (voir p. 7).

C'est ce dernier matériel qui nous a paru le plus favorable pour l'étude cytologique des mastocytes vivants. Leur grand nombre, le fait qu'il s'agit de cellules libres et surtout l'absence de fibres ou de tout autre matériel conjonctif structuré sont autant de facteurs favorables pour permettre des examens microscopiques dans de bonnes conditions.

a) LES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX.

A faible et moyen grossissement. L'observation des cellules péritonéales ⁽¹⁾ en lumière ordinaire ne présente aucune difficulté. Il suffit de placer entre lame et lamelle une goutte du

⁽¹⁾ Nous désignerons sous le nom de « cellules péritonéales », les cellules qui existent à l'état libre dans le liquide péritonéal.

liquide récolté après lavage de la cavité abdominale du rat (voir p. 18). On identifie aisément les mastocytes parmi les nombreuses autres cellules : généralement plus volumineux que les autres éléments péritonéaux, ils sont remarquables par leur aspect sombre; ils apparaissent comme bordés par un liséré tandis qu'une zone centrale semble plus claire.

Mais c'est surtout par l'*observation à fort grossissement* que nous avons réalisé l'étude cytologique des mastocytes péritonéaux. Trois techniques optiques ont été utilisées, à savoir des examens en lumière ordinaire, en contraste de phase et en contraste interférentiel selon Nomarski. Quelles que soient cependant les conditions microscopiques d'observation, le problème le plus ardu à résoudre est sans conteste celui de réduire l'épaisseur des mastocytes sans provoquer de lésions morphologiques. Ces cellules sont globuleuses; lorsqu'on les observe entre lame et lamelle, sans aucun écrasement, la superposition des granules cytoplasmiques s'accompagne d'une diffraction lumineuse telle que l'image obtenue ne permet pas une étude cytologique précise. Pour obtenir un résultat satisfaisant, il faut que la lamelle soit placée directement sur la goutte de liquide de prélèvement déposée sur la lame porte-objet et qu'une légère pression soit exercée sur cette préparation. Si on veut prolonger l'observation dans de bonnes conditions, il est indispensable de sceller la préparation à la paraffine et de l'examiner sur plaque chauffante à 37 °C. De toute façon, la technique recommandée par PAFF et MERGENTHALER (1955) en chambre humide sans compression ne nous a pas donné satisfaction.

Dans ces conditions, les mastocytes apparaissent comme d'assez grandes cellules généralement arrondies, parfois déformées par la présence d'une ou de plusieurs cellules voisines. Leur diamètre est compris entre 15 et 25 μ .

En lumière ordinaire (fig. 1), peu de détails sont visibles mais on devine la présence de nombreux granules cytoplasmiques. Lorsque le mastocyte est en bon état, aucune vacuole ne peut être repérée.

En contraste de phase (fig. 2 et 4), l'analyse cytologique est beaucoup plus aisée. Les granules cytoplasmiques caractéristiques qui apparaissent en gris se retrouvent dans tout le cytoplasme, serrés les uns contre les autres, jusque contre le noyau. Certains d'entre eux sont même parfois superposés à ce dernier.

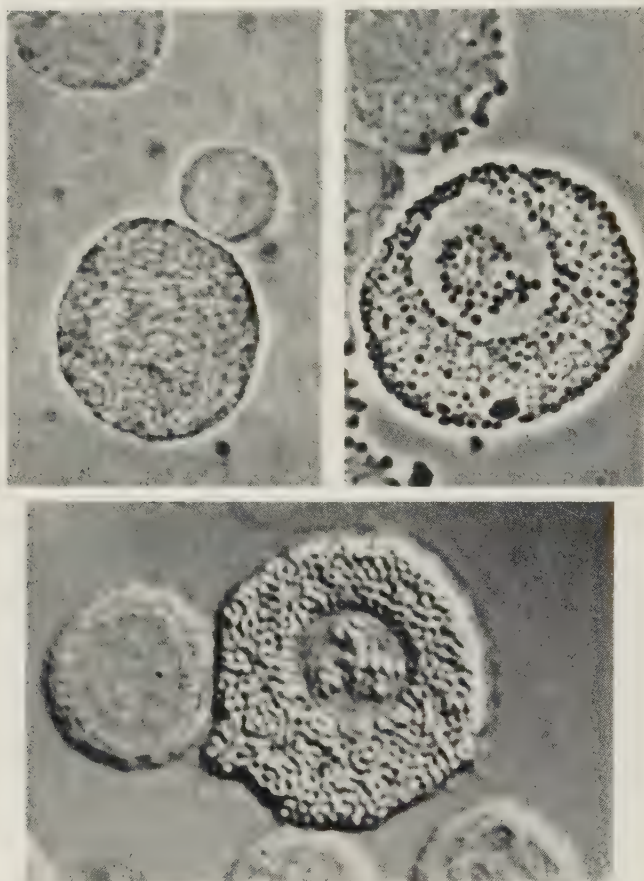


FIG. 1 à 3. *Mastocytes du liquide péritonéal vus vivants dans différentes conditions optiques.*

FIG. 1, en lumière ordinaire (Agr. $\times 1\,750$).

FIG. 2, en contraste de phase (Agr. $\times 1\,750$).

FIG. 3, en contraste interférentiel selon Nomarski (Agr. $\times 1\,750$).

Le mastocyte de la figure 1 est moins étalé, comme on peut s'en rendre compte par le grand nombre de granules superposés au noyau.

Par ailleurs, ils sont sphériques, homogènes et, semble-t-il, sans membrane limitante. Leur diamètre est de l'ordre de $0,5\ \mu$.

Leur noyau est arrondi, parfois légèrement déformé ou ovoïde, jamais incisé; il est relativement petit par rapport au volume cellulaire. Le rapport nucléo-cytoplasmique des mastocytes nous a paru être le plus bas parmi ceux se rapportant aux divers types de cellules rencontrées dans le liquide péritonéal. La chro-

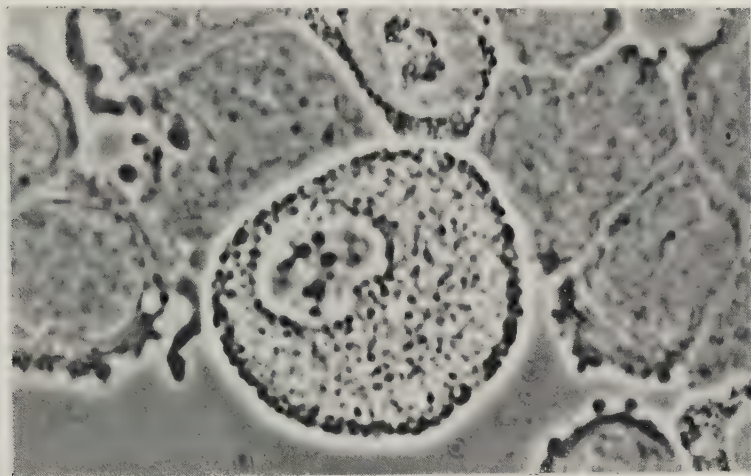


FIG. 4. Cellules libres de la cavité péritonéale examinées vivantes en contraste de phase entre lame et lamelle. Au centre, un mastocyte avec le noyau bien visible; en haut, portion d'éosinophile; sur les côtés, cellules mononucléées à propriétés histiocytaires (Agr. $\times 1\,750$).

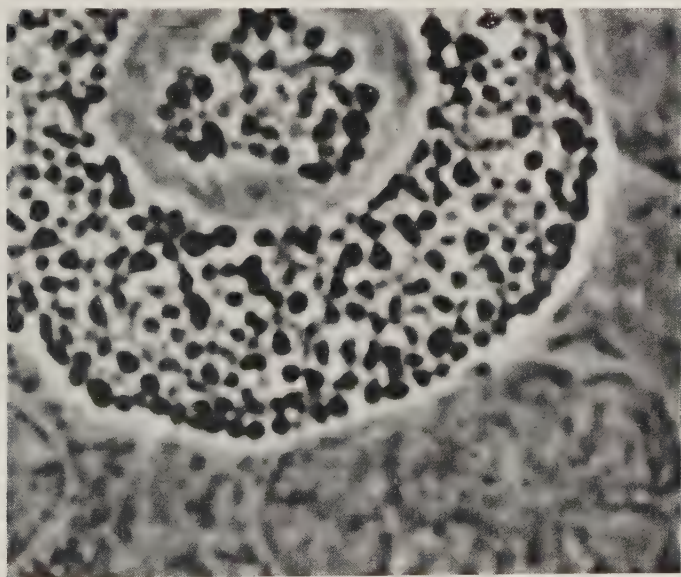


FIG. 5. Vue d'une partie de mastocyte à très fort grossissement et en contraste de phase. Noter l'abondance des granules cytoplasmiques. En raison de l'épaisseur relativement considérable de la cellule, une seule couche de granules est optiquement au point; quelques-uns d'entre eux sont superposés au noyau (Agr. $\times 4\,000$).

matine est répartie en grosses masses floconneuses dans le caryoplasme. Des nucléoles (un ou deux) sont parfois visibles; ils sont arrondis et d'assez petit volume.

A la périphérie des mastocytes, on ne décèle aucune membrane mais la limite cellulaire est constituée par un alignement régulier de granules. On ne constate jamais de formation de voile hyaloplasmique ou de pseudopodes. Même dans les cellules très étalées, nous n'avons pu identifier à coup sûr aucun élément mitochondrial, bien qu'ils existent (fig. 28). Notons dès à présent que, dans ces conditions d'observation, nous n'avons jamais constaté de mouvements spontanés des mastocytes.

Quant aux granules (fig. 5), ils ne semblent pas se déplacer, ni activement, ni passivement. En tout cas, s'ils se déplaçaient, ce serait d'une façon extrêmement réduite et lente. Nous n'avons jamais décelé, à leur niveau, de mouvements browniens, du moins dans un mastocyte en bon état.

Parmi les mastocytes péritonéaux, certains sont binucléés. A l'exception de leur volume plus important, ces mastocytes ne présentent aucune particularité, ni en ce qui concerne la structure de leurs noyaux, ni en ce qui concerne la taille et la morphologie de leurs granules qui sont tout à fait comparables à ceux que l'on rencontre dans les mastocytes mononucléés.

Par ailleurs, nous avons relevé, au cours de cette étude cyto logique, différents aspects morphologiques qui dénotent une certaine altération cellulaire; très souvent, ces lésions ont été interprétées par les auteurs comme des images normales dans des mastocytes en bon état. Certaines de ces cellules peuvent en effet présenter des vacuoles claires et arrondies (fig. 6 et 7), de diamètre varié, souvent inférieur à $1\ \mu$ mais pouvant atteindre 2 à $3\ \mu$. Parfois, elles sont optiquement vides; généralement cependant, elles renferment un granule de taille normale ou augmentée. Ce dernier apparaît toujours moins foncé et moins net que ceux qui ne se trouvent pas dans une vacuole. Dans nos conditions de prélèvement et lorsque le montage de la préparation a été fait avec la délicatesse requise, le nombre de mastocytes présentant des vacuoles cytoplasmiques est extrêmement réduit et pour ainsi dire nul. Lorsque l'examen se prolonge exagérément ou qu'on exerce une pression plus forte sur la lamelle, ces vacuoles apparaissent. Dans ces cas, d'autres signes nous indiquent d'ailleurs, à peu près en même temps

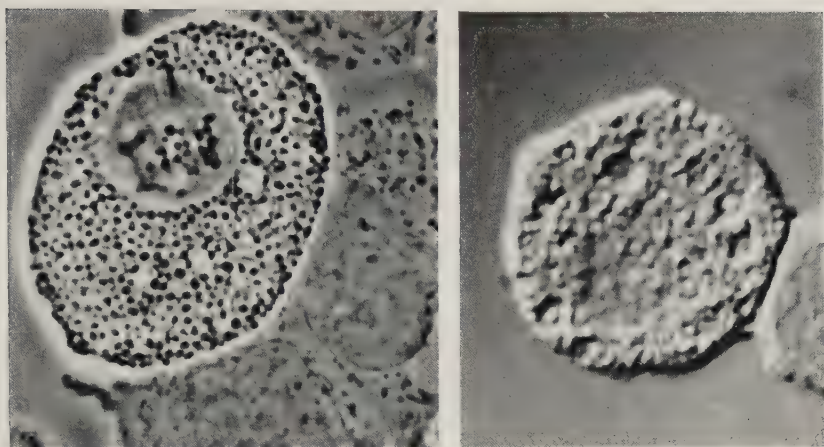


FIG. 6 et 7. Mastocytes péritonéaux lésés au cours des manipulations préalables à l'examen.

FIG. 6, contraste de phase (Agr. $\times 1\,750$).

FIG. 7, contraste interférentiel selon Nomarski (Agr. $\times 1\,750$).

Noter la présence de vacuoles cytoplasmiques et dans certaines d'entre elles d'un granule.

(parfois un peu avant, parfois un peu après, sans qu'il existe un ordre bien établi), qu'il s'agit d'un phénomène d'altération : le noyau s'homogénéise et a tendance à se rétracter, laissant un espace clair entre lui et les granules cytoplasmiques. Pas plus que la présence de vacuoles, les aspects dégénérés du noyau de certains mastocytes en mauvais état ne nous autorisent cependant à considérer les mastocytes habituels comme des cadavres de cellules, comme le pensent POLICARD, COLLET et PRÉGERMAIN (1960). Il s'agit indubitablement, selon nous, d'altérations provoquées par une technique inadéquate ou par une observation trop prolongée. Ces différentes atteintes mastocytaires précèdent d'ailleurs de très peu la dislocation de la cellule qui correspond à la mort de cette dernière ou la suit peut-être de près et non à la manifestation de son fonctionnement normal (voir Discussion).

Il semble cependant qu'on doive considérer le mastocyte comme une cellule fragile, du moins dans ces conditions. En tout cas, alors qu'après observation prolongée les mastocytes sont déjà profondément altérés, les autres cellules péritonéales ne présentent le plus souvent aucune lésion notable.

Parmi les autres éléments figurés du liquide péritonéal, on peut distinguer trois types de cellules qui s'y retrouvent régulièrement. Il y a tout d'abord des cellules mononucléées à noyau volumineux avec souvent des incisures. Leur chondriome bien visible se distingue sous forme de bâtonnets assez courts. Après quelques moments d'observation à 37 °C, ces cellules peuvent se mobiliser et émettre un voile hyaloplasmique. Elles possèdent des capacités histiocytaires et sont capables de phagocyter les débris cellulaires qu'elles rencontrent. Ces cellules histiocytaires constituent la grande majorité des cellules péritonéales, soit 70 % à 80 %. On peut également trouver dans ces suspensions cellulaires des leucocytes éosinophiles et des lymphocytes. Les premiers sont très caractéristiques avec leur noyau généralement en couronne ou en fer à cheval. De plus, ils se distinguent des mastocytes par une taille moindre, des granules plus petits et moins nombreux. Quant aux lymphocytes, leur identification est aisée : ce sont les cellules péritonéales les plus petites, leur noyau régulier est arrondi et leur rapport nucléo-cytoplasmique est particulièrement élevé.

Ajoutons pour être complet que, dans de très rares cas, nous avons observé la présence d'une ou deux cellules détachées du revêtement mésothélial de la cavité abdominale. Ce sont des cellules plates, de grande étendue, avec un noyau ovoïde relativement petit. Quant à la présence éventuelle de globules rouges dans le prélèvement, elle est toujours en rapport avec une faute technique. Lorsque ces derniers éléments sont relativement abondants, on constate des altérations des mastocytes et des leucocytes éosinophiles. Il nous a donc paru sage de ne pas utiliser de telles préparations pour l'analyse cytologique des cellules péritonéales et en particulier des mastocytes.

Au microscope à contraste de phase interférentiel du type Nomarski (fig. 3), les mastocytes apparaissent en relief d'une manière très nette. Ce dispositif optique permet de mieux discerner les granules cytoplasmiques comme d'innombrables petits corps sphéroïdes ayant chacun à peu près la même taille. Ils sont situés dans toutes les régions du cytoplasme. Le noyau correspond à une zone claire à limite nette. La mise en évidence de lésions mastocytaires — comme les vacuoles cytoplasmiques que nous avons signalées en rapportant nos observations en contraste de phase — est ici particulièrement aisée. Par examen en contraste interférentiel, nous avons pu établir qu'initialement ces vacuoles contiennent toujours un granule. Ce n'est que par après, quand l'atteinte s'accroît, que le granule peut quitter la vacuole.

L'étude sur le vivant du mastocyte péritonéal de rat, par ces différentes techniques optiques, démontre que cette cellule possède une morphologie particulière propre qui permet de la distinguer aisément des autres éléments. Jamais, au cours de notre travail, nous n'avons rencontré de forme cellulaire qui puisse faire penser soit à une transformation d'un type cellulaire quelconque en mastocyte ou inversement, soit à un processus de « maturation » de certains éléments qui donneraient ainsi naissance aux mastocytes bien différenciés que nous venons de décrire.

b) COLORATIONS SUPRA-VITALES.

Mis en présence d'une solution diluée de rouge neutre dans du liquide de Ringer (à 1/10 000 ou à 1/20 000), les mastocytes montrent des granules nettement colorés en rouge. Le temps de contact nécessaire pour obtenir une intense coloration est court. Il est nettement inférieur à celui qui est nécessaire pour mettre en évidence les grains et vacuoles des histiocytes ou macrophages. Le rouge neutre ne paraît pas être toxique dans un bref délai pour les mastocytes. Notons que les granules expulsés dans le milieu extra-cellulaire (au cours de manipulations trop brutales, par exemple), restent colorés.

D'autres colorations supra-vitales ont été réalisées, notamment avec des colorants basiques comme le bleu de toluidine ou le bleu de crésyl brillant. Nous avons renoncé rapidement à l'emploi du premier en raison de sa forte toxicité. Dès qu'il est mis en présence des mastocytes (même à des concentrations allant jusqu'à 2/100 000), celui-ci colore non seulement les granules (teinte métachromatique) mais pénètre également dans le noyau (qui prend une teinte orthochromatique). Cette atteinte nucléaire marque le début d'une rapide dégénérescence de la cellule qui, finalement, se désagrège complètement; on sait par ailleurs que le bleu de toluidine possède des propriétés histamino-libératrices (SMITH, 1958). Quant au bleu de crésyl brillant qui a été recommandé par DALCO (1958) à la place du bleu de toluidine, il permet, à la concentration de 1/20 000, de colorer métachromatiquement les granules mastocytaires sans léser la cellule, du moins de manière apparente (cf. BAECKELAND, 1958, pour les mastocytes mésentériques du rat).

Enfin, nous avons mis les mastocytes en présence de vert Janus. Leurs granules cytoplasmiques ne prennent pas ce colorant. Nous n'avons pas décelé de mitochondries. Elles sont vraisemblablement cachées par les granules; il faut cependant noter que la réfringence considérable des granules permettrait difficilement de percevoir la faible coloration que le vert Janus développe au niveau des éléments mitochondriaux.

B. — MORPHOLOGIE DES MASTOCYTES PRÉSENTS DANS LES PRÉPARATIONS FIXÉES

La plupart de nos observations ont été faites après fixation dans des solutions alcooliques à base d'acétate de plomb (voir *Matériel et Techniques*).

Une des meilleures techniques pour l'étude des mastocytes fixés consiste à utiliser le bleu alcian ainsi que, comme coloration nucléaire complémentaire, le Kernechtrot (voir p. 21). De cette façon, l'identification des mastocytes est très aisée et les images particulièrement nettes. Dans ces conditions, les mastocytes apparaissent comme des éléments relativement volumineux et nettement limités. Leur forme générale est le plus souvent arrondie ou ovoïde, parfois allongée; certains mastocytes possèdent un ou deux gros prolongements largement implantés sur le corps cellulaire et se terminant par un bout arrondi. La variété de silhouette que ces cellules présentent semble dépendre des structures voisines, en particulier des fibres conjonctives qui se trouvent aux environs; les mastocytes sont généralement étirés suivant la direction générale de ces fibres; de plus, ils semblent se mouler sur ces dernières et nous avons pu observer des crêtes d'empreinte bien visibles, notamment dans des étallements de mésentère. Au contraire, lorsqu'on fixe des préparations réalisées avec des suspensions de cellules péritonéales, les mastocytes qu'on y repère sont le plus souvent arrondis; certains conservent cependant une forme ovale.

Dans tous les cas, le noyau occupe une situation centrale; il est généralement ovoïde ou arrondi, en rapport avec la forme générale de la cellule. Lorsque le liquide fixateur est à base d'acétate basique de plomb ou est constitué d'alcool éthylique à 80 vol. %, la chromatine est finement granuleuse et répartie

de façon homogène. Signalons qu'au cours de nos recherches, nous avons eu l'occasion de rencontrer des mastocytes binucléés dans différents tissus, notamment dans l'intestin et le mésentère. Ces formes mastocytaires ne se retrouvent donc pas uniquement dans le liquide péritonéal où nous les avons déjà décrites.

Dans le cytoplasme, on distingue de très nombreux granules, toujours répartis de façon homogène; entre ces granules, nous n'avons pas observé de petites vacuoles ou vésicules qui correspondraient à celles que nous avons vues se former sur le vivant, lorsque le mastocyte était en mauvais état. Par ailleurs, lorsque la fixation est convenable, nous n'avons pas observé de granules en dehors du cytoplasme, dans les espaces intercellulaires ou dans les phagocytes du voisinage.

2. — CYTOPHYSIOLOGIE DES MASTOCYTES

On sait que certains types de cellules se distinguent par un ensemble remarquable non seulement de caractères cytologiques mais également de propriétés biologiques : c'est notamment le cas des cellules histiocytaires (CHÈVREMONT, 1942). De même, nous avons tenté de caractériser les mastocytes à ce second point de vue. Parmi les propriétés biologiques qu'il y a lieu d'envisager dans leur cas, nous retiendrons l'athrocytose, la phagocytose, la motilité et le tactisme, la capacité de multiplication, la richesse en diverses substances, en particulier en amines biogènes. Pour ce qui concerne la libération de ces dernières, nous aborderons au chapitre II les problèmes qui s'y rattachent. Quant à la phagocytose, son étude sera entreprise au chapitre III (voir p. 165).

A. — CAPACITÉ D'ATHROCYTER LE BLEU TRYPAN ET L'ENCRE DE CHINE

Trois rats ont reçu, pendant trois jours consécutifs, une injection intrapéritonéale quotidienne de 0,5 ml d'une solution à 1 % de bleu trypan; deux autres rats ont reçu une injection quotidienne de 0,5 ml d'une suspension à 10 % d'encre de Chine de marque Pelikan.

Des coupes ont été faites notamment dans la peau et le conjonctif sous-péritonéal. Dans aucun cas nous n'avons pu mettre en évidence la moindre capacité d'athrocytose des mastocytes, alors que des cellules histiocytaïres voisines avaient pris avidement soit le bleu trypan soit l'encre de Chine (fig. 8).

Ce problème de l'athrocytose sera de nouveau envisagé dans les conditions de la culture *in vitro* (voir p. 165).

B. MOTILITÉ ET TACTISME

Rappelons qu'au cours de nos observations cytologiques, nous n'avons vu aucun déplacement des mastocytes. *In vivo* et dans certaines circonstances expérimentales, ces cellules peuvent cependant se déplacer, comme nous en avons apporté la preuve chez le cobaye (BAECKELAND, 1950a). En effet, si on implante un caillot de sang de lapin sous la peau de la région dorso-lombaire d'un cobaye, on constate que, dans le voisinage, le nombre de mastocytes sous-épidermiques augmente dès le 2^e jour pour atteindre un maximum le 5^e jour. A ce moment, il y a quinze fois plus de mastocytes dans cette région qu'avant l'expérience. Par après, leur nombre décroît rapidement. Cette augmentation est trop considérable pour pouvoir être confondue avec des variations individuelles ou locales.

Cet important enrichissement tissulaire en mastocytes est localisé à la région immédiatement voisine du caillot; il est cependant encore appréciable à 1 cm de celui-ci. Ces cellules forment, dans le derme et le tissu conjonctif sous-cutané, de véritables nodules de mastocytes qui ne semblent pas être en rapport avec les vaisseaux. De plus, après 2 à 3 jours, les mastocytes apparaissent non seulement dans l'exsudat qui se trouve autour du caillot, mais aussi à l'intérieur même de ce dernier où ils semblent se dégranuler (BAECKELAND, 1950b). Par ailleurs, au cours de ces observations, nous n'avons pas vu de mitoses de mastocytes.

Nous avons répété des expériences analogues en implantant des caillots de sang de lapin dépourvus de globules rouges (plasma coagulé). Les réactions sont identiques mais plus discrètes, l'augmentation des mastocytes sous-épidermiques, quoique nette, est moins forte et plus tardive. Signalons que HISSARD

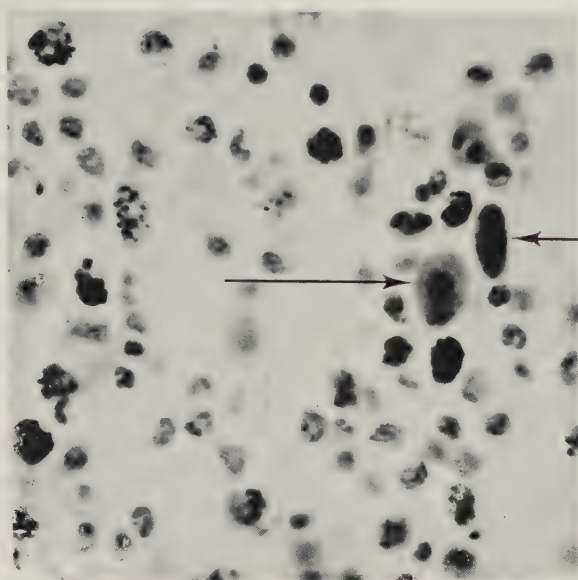


FIG. 8. Deux mastocytes (indiqués par des flèches) au sein du tissu conjonctif sous-péritonéal dont certaines cellules histiocytaires ont absorbé de l'encre de Chine. Mise en évidence des mastocytes par le vert de méthyle après réaction de Feulgen; l'inférieur est bien reconnaissable ici; le supérieur, bien reconnaissable dans la préparation, l'est cependant moins ici. Leur cytoplasme, nettement vert dans la préparation, apparaît ici uniformément gris; on n'y décèle aucune trace d'encre de Chine (Agr. $\times 700$).

et coll. (1953) ont procédé à des expériences du même type en implantant un caillot de sang de bovin sous la peau du rat. Ils confirment, chez cette espèce, le phénomène que nous avons observé chez le cobaye.

Il semble donc bien que, dans ces conditions, le caillot sanguin implanté exerce un tactisme sur les mastocytes des tissus immédiatement voisins et les attire vers lui. Ils sont donc capables de se déplacer dans ces circonstances expérimentales comme l'atteste formellement leur pénétration dans le caillot.

Toutefois, *normalement* les mastocytes ne semblent pas se mouvoir activement ou tout au moins, s'ils le font, leurs mouvements sont extrêmement réduits. A côté de nos observations cytologiques de mastocytes péritonéaux que nous venons de rappeler, nous avons aussi examiné ces cellules dans des fragments de mésentère maintenus en survie *in vitro* à 37 °C en présence de bleu de crésyl brillant en solution saline (voir

ci-dessus). Dans ces conditions, aucun déplacement de mastocytes n'a été décelé (BAECKELAND, 1958).

C. — CAPACITÉ DE MULTIPLICATION

On peut se demander si les mastocytes peuvent se multiplier par mitose. Rappelons qu'au cours des différentes observations que nous avons faites tant sur le vivant que sur préparations fixées, nous n'avons identifié aucune figure mitotique.

D'autres techniques permettent cependant de déceler des processus généralement en relation avec la préparation à la mitose. Par des dosages cytophotométriques d'ADN en lumière visible après réaction de Feulgen, on peut rechercher les cellules qui sont en train de réaliser ou ont déjà réalisé une synthèse en ces acides nucléiques préalable à la mitose. De même, par l'étude de préparations histautoradiographiques à base de thymidine tritiée, il est possible de mettre en évidence des cellules qui, au moment de leur synthèse d'ADN, ont incorporé ce nucléotide.

Ces techniques sont d'un grand intérêt pour mettre en évidence des processus mitotiques peu fréquents, dans un matériel où l'index mitotique est faible ou nul. On sait, en effet, qu'en raison de la faible durée de la mitose par rapport à celle de la synthèse des ADN et à la post-synthèse qui lui fait suite, on doit s'attendre à ce que les cellules « tétraploïdes » du point de vue des ADN ainsi que celles qui ont incorporé de la thymidine tritiée soient beaucoup plus nombreuses que celles qui sont en mitose.

a) DOSAGES CYTOPHOTOMÉTRIQUES D'ADN APRÈS RÉACTION DE FEULGEN DANS DES NOYAUX DE MASTOCYTES PÉRITONÉAUX ET MÉSENTÉRIQUES.

Après fixation au liquide de Carnoy d'étalements de mésentère et de préparations de cellules libres péritonéales, nous avons réalisé la réaction de Feulgen. Nous avons ensuite mis les mastocytes en évidence par le vert de méthyle en solution dans l'alcool éthylique à 50 vol. % (pour les détails, voir ALLEN, 1962).

Pour les dosages proprement dits, nous avons utilisé l'appareillage mis au point par H. FIRKET (1955) au Laboratoire d'Histologie de l'Université de Liège. Sans entrer dans les détails de cette technique (voir FIRKET, 1958), précisons que les mesures ont été faites en lumière monochromatique dont la longueur d'onde était de 510 m μ ⁽¹⁾ (en raison de l'intensité de la coloration de certains noyaux) et que le « blanc » de référence a été systématiquement pris en dehors des structures cellulaires.

Nous avons déterminé la teneur en ADN de 98 noyaux de mastocytes péritonéaux et de 100 noyaux de mastocytes mésentériques. Les résultats ont été rassemblés dans les histogrammes représentés aux figures 9 et 10. Tous les mastocytes — sauf un, dans le mésentère — possèdent une quantité d'ADN qui s'écarte de moins de 50 % des valeurs « diploïdes » moyennes de chacune des séries et sont, de ce fait, considérés comme « diploïdes ». La très grande majorité des mastocytes sont donc « en repos »

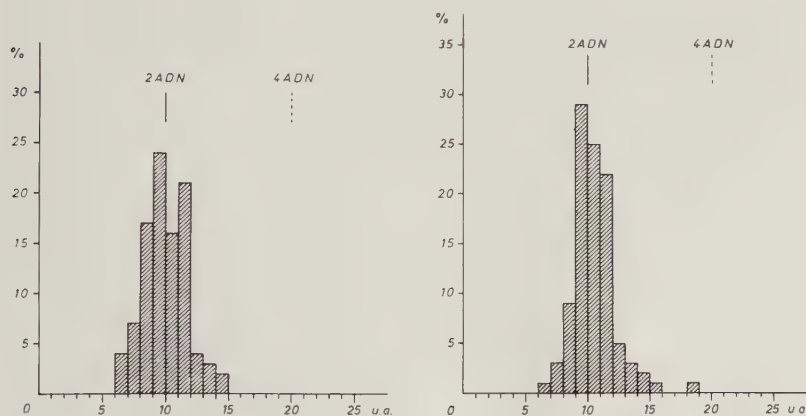


FIG. 9 et 10. Dosages cytophotométriques d'ADN dans des noyaux de mastocytes après réaction de Feulgen.

A droite (fig. 9), mastocytes péritonéaux; nombre de noyaux mesurés : 98; tous possèdent des quantités d'ADN correspondant à des valeurs « diploïdes ».

A gauche (fig. 10), mastocytes mésentériques; nombre de noyaux mesurés : 100; un d'entre eux réalise sa synthèse en ADN et sa teneur est proche de la valeur tétraploïde « calculée ».

⁽¹⁾ Si nous avions fait nos dosages à une longueur d'onde proche de 550 m μ (où l'absorption est maximale dans le cas de la réaction de Feulgen) un grand nombre de noyaux auraient souvent dépassé une absorption de 0,70. Dans ces dernières conditions, les mesures sont imprécises.

du point de vue des ADN. Cependant, l'un d'entre eux a indubitablement une teneur en ADN supérieure, presque double de la valeur moyenne « diploïde ». Dans le cas de ce mastocyte isolé, il s'agit très vraisemblablement d'une préparation à la mitose; en effet, en l'absence d'autres valeurs « tétraploïdes », on pourrait difficilement soutenir que les mastocytes présentent une « polyploïdie » habituelle.

Les sérieuses difficultés que nous avons dû surmonter pour doser les ADN dans les mastocytes ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats aussi précis que lors de recherches précédentes effectuées sur d'autres matériels; le coefficient de variation relativement élevé, pour l'une comme pour l'autre série, en témoigne à suffisance. Une des principales causes d'erreur est constituée par la fine couche cytoplasmique qui se superpose au noyau et qui, comme nous l'avons vu au cours de nos examens en contraste de phase, contient assez souvent des granules. Ceux-ci possèdent une réfringence appréciable; ils sont légèrement Schiff positifs (voir p. 59); enfin, pour identifier les mastocytes, les granules ont dû être colorés par le vert de méthyle. Il est évident que, dans ces conditions, la quantité d'ADN par noyau sera surestimée. C'est d'ailleurs ce que nous avons vérifié en recherchant dans la même préparation la valeur « diploïde » moyenne d'une série de noyaux appartenant à des cellules autres que les mastocytes; cette valeur est inférieure de 8 % à celle qui avait été calculée pour les mastocytes. La différence entre les valeurs moyennes est cependant trop faible pour qu'en dépit de cette imprécision relative on puisse mettre en doute la validité de l'application de cette technique dans le but de rechercher les cellules « tétraploïdes » du point de vue des ADN.

Des dosages ont également été faits sur les noyaux de trois mastocytes binucléés rencontrés incidemment dans le mésentère. Pour une même cellule, les teneurs d'ADN de chacun des deux noyaux sont les mêmes, à 5 % près, et correspondent à des valeurs « diploïdes ».

b) HISTOAUTORADIOGRAPHIE À BASE DE THYMIDINE TRITIÉE.

Trois rats, âgés de 69, 70 et 73 jours et pesant respectivement 160, 170 et 175 g, ont reçu 15 μ c/g de thymidine tritiée en une seule injection sous-cutanée et ont été sacrifiés 4 heures après le

traitement. Nous avons étudié les mastocytes dans des préparations de cellules péritonéales libres et dans des coupes provenant de différents tissus, mais principalement de peau. Nous avons examiné 3 000 mastocytes péritonéaux et 3 000 mastocytes tissulaires. Sur ces 6 000 cellules, un seul mastocyte péritonéal était marqué. Dans nos conditions d'expérience, la fréquence des mastocytes ayant incorporé de la thymidine tritiée et réalisant donc une synthèse en ADN est ainsi extrêmement faible. Ce résultat est en parfait accord avec les données cytophotométriques rapportées ci-dessus.

Bref, la multiplication des mastocytes dans l'organisme adulte est très faible. Sur 198 mastocytes, un seul possède un noyau à valeur « tétraploïde » en ADN; nous n'avons observé qu'un mastocyte ayant incorporé de la thymidine sur 6 000 cellules de ce type examinées; quant à l'index mitotique, il est voisin de zéro. A titre de comparaison, signalons que, dans des tissus en croissance active, des cultures de fibroblastes de poulet, âgées de 34 heures par exemple, l'index mitotique est de 20 ‰ et le pourcentage des noyaux à valeurs « tétraploïdes » est de 20 à 30 % (CHÈVREMONT, CHÈVREMONT-COMHAIRE et BAECKELAND, 1959). Dans des cultures analogues mais croissant plus faiblement, ce pourcentage est encore d'environ 5 % (BAECKELAND, CHÈVREMONT et CHÈVREMONT-COMHAIRE, 1958); dans des cultures âgées, il est pratiquement nul.

3. — CYTOCHIMIE DES MASTOCYTES

Du point de vue cytochimique, les mastocytes sont caractérisés par la présence de deux groupes principaux de substances : d'une part, des mucopolysaccharides sulfatés, d'autre part des amines biogènes. C'est surtout l'étude de ces substances qui a retenu notre attention.

En ce qui concerne les premières, leur présence ne fait pas de doute, puisque les granules cytoplasmiques sont métachromatiques au bleu de toluidine. Par contre, la nature de ce ou de ces mucopolysaccharides sulfatés fait encore l'objet de discussions. De plus, la coexistence possible de ces mucopolysaccharides avec d'autres non sulfatés, éventuels précurseurs ou non des premiers, ne peut être exclue *à priori*.

Quant aux amines biogènes, histamine ou 5-hydroxytryptamine principalement, si les dosages biochimiques ou biologiques suggèrent qu'elles ont un rapport étroit avec les mastocytes, leur démonstration cytochimique manque généralement de spécificité et les résultats apparaissent souvent difficilement interprétables.

Bref, l'étude cytochimique des constituants de base des mastocytes est loin d'être achevée; elle est à peine esquissée.

A. — ÉTUDE DES MUCOPOLYSACCHARIDES SULFATÉS

a) MISE EN ÉVIDENCE PAR DES RÉACTIONS ÉLECTIVES DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES.

Pour la mise en évidence des mucopolysaccharides acides, nous retiendrons : la métachromasie après utilisation de certains colorants basiques comme le bleu de toluidine, la réaction avec des colorants du groupe des phtalocyanines tels que le bleu alcian 8 GS (fig. 11) et la coloration par la fuchsine-paraldéhyde sans oxydation préalable (procédé de GABE, 1953). Bien que ces diverses techniques soient fréquemment employées pour



FIG. 11. Mise en évidence des mucopolysaccharides sulfatés des mastocytes par le bleu alcian dans une préparation de cellules péritonéales. Les cellules autres que les mastocytes ne sont pas du tout colorées et, de ce fait, non visibles sur la photo (Agr. $\times 815$).

déceler la présence des mastocytes dans les préparations histologiques, leur signification cytochimique n'a pas encore été très bien précisée.

Un premier point qui concerne ces trois modes de mise en évidence et sur lequel nous voudrions insister est le suivant : *tous* les mastocytes présents dans nos préparations habituelles de cellules péritonéales se colorent. On peut s'en assurer aisément en les examinant, après fixation, au microscope en contraste de phase, lequel permet d'identifier les mastocytes par leurs granules caractéristiques. Dans les coupes à la paraffine, cette méthode ne présente ni la même facilité ni la même certitude. Néanmoins, de nos observations répétées de très nombreux tissus (voir l'étude de la distribution des mastocytes chez le rat), nous avons cependant retiré l'impression que *tous* les mastocytes tissulaires mis en évidence par le bleu de toluidine se colorent par le bleu alcian ainsi que par la méthode à la fuchsine-paraldéhyde et inversement. C'est ce que nous avons pu établir en colorant différemment des coupes voisines ou, parfois, en réalisant des colorations successives de la même coupe.

En ce qui concerne plus particulièrement la métachromasie obtenue au niveau des granules des mastocytes colorés par le bleu de toluidine, notons que son intensité semble être différente d'une cellule à l'autre, même quand on utilise une solution de bleu de toluidine tamponnée à pH acide. La variabilité de la teinte métachromatique ne paraît pas être en rapport avec le volume cellulaire.

Pour le bleu alcian, nous avons recherché si on ne pouvait pas accroître sa spécificité soit en modifiant le pH soit en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ ajouté au milieu, selon les conseils de SCOTT et DORLING (1965). En ce qui concerne le pH, nos observations confirment totalement celles de LEV et SPICER (1964). Si le pH est abaissé aux environs de 0,2, seuls certains éléments contenant des mucopolysaccharides acides à groupements sulfuriques restent positifs, c'est-à-dire essentiellement les mastocytes et la substance fondamentale cartilagineuse.

Par contre, en ce qui concerne l'intensité de la coloration des granules mastocytaires, l'influence du pH et celle de différentes concentrations de $MgCl_2$ ne nous ont pas paru manifestes. En effet, nous les avons étudiées sur les mastocytes péritonéaux après fixation soit au formol salé à 4 %, soit à l'alcool-formol,

soit encore au liquide de Carnoy. Comme dans notre technique habituelle, la concentration en bleu alcian 8 G spécial était de 0,05 % et la durée du passage dans la solution colorante maintenue à la température du laboratoire était pour tous les cas de 15 minutes. Cependant, quel que soit le pH (5,7; 2,3 ou 0,2), quelle que soit la concentration en bleu alcian de la solution (des essais ont été faits en augmentant cette concentration jusqu'à 2 %) et quelle que soit la teneur en $MgCl_2$, l'intensité de la coloration des mastocytes n'est pas modifiée. Elle semble dépendre principalement du temps pendant lequel la préparation reste au contact de la solution. Aucune différence en relation avec le mode de fixation histologique n'a été observée.

Effet de la « méthylation ». En vue de vérifier si, comme nous le pensons, la métachromasie au bleu de toluidine des mastocytes et leur mise en évidence par le bleu alcian ou la fuchsine-paraldéhyde est bien due à la présence de groupements sulfuriques, il nous a paru indispensable de soumettre ces cellules à une méthylation préalable.

Celle-ci consiste à maintenir les préparations dans un bain d'alcool méthylique contenant 0,8 ml d'acide chlorhydrique concentré pour 100 ml pendant une durée variable (de 3 à 24 heures). Ce procédé a au moins deux effets : d'une part, il conduit à l'estérification des groupes carboxyles (FISHER et LILLIE, 1954); d'autre part, il libère par méthanolyse les radicaux sulfuriques (KANTOR et SCHUBERT, 1957).

Nos essais ont été effectués après fixation à l'alcool-formol sur préparations de cellules péritonéales et sur coupes, après inclusion à la paraffine. Si, après méthylation, on colore au bleu de toluidine, les mastocytes ne sont plus chromotropes, ni positifs au bleu alcian et à la fuchsine-paraldéhyde. Ce traitement doit être d'au moins quatre heures pour les mastocytes péritonéaux, de plus de douze heures pour les mastocytes tissulaires rencontrés dans les coupes. En ce qui concerne les préparations colorées au bleu de toluidine, remarquons qu'après une méthylation suffisamment efficace pour supprimer la métachromasie des mastocytes, l'intensité de la basophilie est très fortement affaiblie. Bien que le processus de méthylation soit dans une certaine mesure plus ou moins rapide suivant les préparations, ce fait n'implique nullement que les mastocytes tissulaires soient de constitution différente de celle des mastocytes péri-

tonéaux. Nous pensons que, dans ce dernier cas, les effets de la méthanolyse peuvent s'exercer plus rapidement parce qu'ils ne sont pas enrobés dans les tissus. Nous avons d'ailleurs remarqué que dans une coupe de 3 μ , l'effet de la méthylation est plus apparent que dans une coupe de 5 μ .

« *Saponification* » après « *méthylation* ». Lorsque, après méthylation, on procède à la saponification des préparations (par immersion dans une solution de KOH à 1 % dans l'alcool éthylique à 80 vol. %, pendant vingt minutes et à la température du laboratoire) (LILLIE, 1958), on rétablit la réactivité des groupes carboxyles préalablement estérifiés par les groupements méthyles. Par exemple, si on colore au bleu de toluidine des préparations ayant subi ce traitement, il est possible d'observer le caractère chromotrope de mucopolysaccharides à groupements carboxyliques et de déceler à leur niveau une coloration métachromatique. Il n'en est pas de même pour les mucopolysaccharides sulfatés car les groupements ester sulfurique ont été éliminés.

Dans aucun cas, la saponification des préparations n'a rétabli ni la métachromasie au bleu de toluidine ni la positivité au bleu alcian ou à la fuchsine-paraldéhyde au niveau des mastocytes.

« *Sulfatation* » après « *méthylation* ». Si, après « *méthylation* », on soumet les cellules péritonéales à une « *sulfatation* » (par immersion dans l'acide sulfurique concentré à la température du laboratoire), on constate que, après 3 à 5 minutes, les mastocytes redeviennent métachromatiques et bleu alcian positifs. Ces réactions ont cependant perdu leur électivité pour les mucopolysaccharides de poids moléculaire élevé qui, avant méthylation, possédaient des groupements ester sulfurique. Des cellules autres que les mastocytes sont métachromatiques ou bleu alcian positives, beaucoup plus faiblement que les mastocytes il est vrai. Nous pensons qu'il ne faut donc pas attacher une importance exagérée à cette dernière réaction car sa spécificité semble être réduite.

Traitement par l'hyaluronidase testiculaire ou bactérienne. Après fixation par l'alcool-formol, des cellules péritonéales déposées sur lames ont été traitées par une préparation d'hyaluronidase testiculaire (de marque Sigma) à la concentration de 1 mg par ml dans une solution aqueuse tamponnée. Des essais ont été notamment faits à pH 4,8 (tampon de Walpole), à

pH 6,0 (tampon de Sørensen) et à pH 7,0 (tampon de Sørensen). La durée d'incubation à 37 °C a été le plus souvent de 14 heures, parfois de 36 heures. Quant à l'hyaluronidase bactérienne (de marque Choay), elle fut utilisée pour un petit nombre de préparations à pH 7,0 et à la concentration de 15 unités par ml (temps d'incubation : 36 heures).

Quelles que soient les conditions d'action ou la nature de l'hyaluronidase, nous n'avons observé aucun effet perceptible sur la coloration des mastocytes par le bleu de toluidine ou le bleu alcian.

Nos observations démontrent donc que, selon toute probabilité, la métachromasie au bleu de toluidine aussi bien que la coloration au bleu alcian ou à la fuchsine-paraldéhyde, dépendent uniquement de la présence de groupements ester sulfurique dans une substance mucopolysaccharidique intervenant dans la constitution des granules mastocytaires. D'ailleurs, depuis que LISON l'a montré en 1935, personne ne conteste plus que les mucopolysaccharides sulfatés soient métachromatiques. Pour notre part, nous avons observé que le bleu alcian et la fuchsine-paraldéhyde ne colorent les mastocytes que si ceux-ci peuvent encore présenter une coloration métachromatique au bleu de toluidine. Par conséquent, il semble que, dans le cas des mastocytes, la positivité au bleu alcian et la positivité à la fuchsine-paraldéhyde aient la même signification que la métachromasie au bleu de toluidine : elles correspondraient à une mise en évidence des mucopolysaccharides sulfatés de poids moléculaire élevé.

. * .

De très nombreux autres colorants ont une affinité élective pour les mastocytes : l'azur A qui donne au niveau des mastocytes une métachromasie analogue à celle du bleu de toluidine; le bleu astra, qui est proche du bleu alcian par sa constitution chimique, etc. Certains d'entre eux peuvent vraisemblablement réagir avec les substances présentes dans le cytoplasme mastocytaire par un mécanisme tout à fait différent de celui que nous avons admis pour les trois méthodes dont nous venons d'étudier en détails la signification, et mettre en évidence d'autres constituants. C'est ce qu'ont suggéré quelques chercheurs, notamment pour la safranine.

En 1960, SPICER a observé qu'en colorant successivement les mastocytes par le bleu alcian puis par la safranine, certaines de ces cellules étaient colorées en bleu, d'autres en rouge. WORTHINGTON et BAILEY (1962) constatent que, par cette même technique, les mastocytes sont généralement bicolores, possédant parfois une majorité de grains bleus, parfois une majorité de grains rouges. Ces dernières observations ont été confirmées par HORSFIELD (1966) qui en conclut que la solution de safranine extrait un constituant bleu alcian positif des granules mastocytaires.

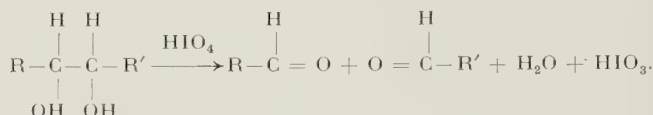
Nous avons repris les conditions expérimentales de Worthington et Bailey (fixation dans une solution de formol à 10 %, coloration au bleu alcian à pH 0,5 et coloration par la safranine). Ces auteurs n'indiquent pas la nature de la safranine utilisée, ni la durée de leurs bains colorants. Pour notre part, nous avons employé de la safranine 0 (solution à 1 % dans l'acide chlorhydrique normal). Après coloration dans une solution de bleu alcian à 0,05 % pendant 15 minutes, toutes les préparations (de cellules péritonéales de rat) ont été plongées dans la solution de safranine pendant des temps variant de 1 à 15 minutes. Les résultats sont les suivants : pour des temps courts (1 à 3 minutes), les mastocytes présentent uniquement des granules bleus; pour des temps égaux ou supérieurs à 5 minutes, certains granules sont bleus, d'autres rouges, le nombre de ces derniers augmentant au fur et à mesure que le passage dans la safranine se prolonge. Par ailleurs, si des préparations, qui ont été immergées pendant 15 minutes dans la safranine et dont les granules mastocytaires sont par conséquent presque tous rouges, sont recolorées par le bleu alcian dans les mêmes conditions que la première fois, on constate qu'ils prennent avidement le bleu alcian et se colorent intensément en bleu. Nous croyons pouvoir conclure de ces expériences que, contrairement à l'opinion de Horsfield, il n'y a certainement pas eu extraction d'une substance bleu alcian positive par la solution de safranine et que, vraisemblablement, il s'agit ici d'une compétition entre deux colorants pour des radicaux de même nature.

b) GROUPEMENTS VIC-GLYCOLS ET STRUCTURES SCHIFF POSITIVES.

Rappelons brièvement le principe de ces réactions, dont la plus employée est celle du PAS : sous l'action du traitement par des oxydants appropriés, utilisés dans des conditions déterminées, il est possible de rompre une chaîne polysaccharidique entre deux carbones porteurs de

radicaux glycols qui se transforment alors en groupements aldéhydiques; ces derniers peuvent alors être mis en évidence par le réactif de Schiff.

Exemple :



Qu'on utilise l'acide périodique, le tétra-acétate de plomb ou l'acide chromique (réaction de Bauer), le mécanisme des différentes réactions semble analogue. Cependant, la réaction au PAS est généralement recommandée car l'oxydation s'arrête au stade aldéhydique et il n'y a pas production d'acides carboxyliques comme cela arrive avec des oxydants trop brutaux.

La spécificité de la réaction dépend donc, dans une grande mesure, des conditions d'oxydation des polysaccharides. En tout état de cause, des structures Schiff positives avant oxydation ne peuvent être considérées à priori comme constituées de polysaccharides. Cependant, la majorité des substances colorées après la réaction au PAS semblent être de nature polysaccharidique. Tous les polysaccharides ne sont cependant pas mis en évidence par la réaction au PAS. Il faut que les groupements vic-glycols (ou éventuellement les radicaux α -hydroxyamine primaires — CHOH — CHNH soient libres. Lorsque, par exemple, comme c'est le cas pour l'héparine trisulfurique, les groupements glycols sont estérifiés par l'acide sulfurique, on peut prévoir que, théoriquement, ce polysaccharide restera PAS négatif. L'héparine mono-sulfurique, au contraire, donnerait une réaction positive (JORPES et GARDELL, 1948).

Selon JORPES et ses collaborateurs (1948) ainsi que selon FRIBERG et ses collaborateurs (1951), la réaction au PAS serait positive au niveau des granules cytoplasmiques des mastocytes chez certaines espèces animales, comme le rat. Chez d'autres, comme le lapin, cette réaction serait négative (MONTAGNA et coll., 1954); chez d'autres encore, comme le hamster (COMPTON, 1952), certains mastocytes seraient PAS positifs, d'autres PAS négatifs.

Nous avons également effectué la réaction du PAS (pour les détails, voir LISON, 1960; surtout par la méthode de MacManus, parfois par celle de Hotchkiss) et celle de Bauer, soit sur des lames où nous avons déposé des cellules péritonéales, soit sur des coupes. Que l'on utilise l'une ou l'autre de ces réactions, le cytoplasme des mastocytes et en particulier leurs granules sont nettement colorés en rouge. Cette coloration est régulièrement et franchement positive dans les mastocytes péritonéaux, quelle que soit la fixation (alcool éthylique à 80 vol. %, alcool-formol

ou liquide de Carnoy); dans les coupes, l'intensité de la réaction varie toutefois en intensité d'un mastocyte à l'autre et d'une préparation à l'autre sans rapport, semble-t-il, avec l'une ou l'autre de ces trois fixations.

Cependant, nous nous sommes rendu compte que, même si on omet l'oxydation par l'acide periodique, le cytoplasme des mastocytes présente une coloration positive avec le réactif de Schiff. Dans ces conditions, la réaction au PAS est évidemment dépourvue de signification et on ne peut pas affirmer qu'il existe au niveau de ces cellules des polysaccharides à groupes vic-glycols libres. De même, la réaction de Bauer, positive aussi au niveau des mastocytes, perd toute sa valeur. Nous avons d'ailleurs observé incidemment qu'après une réaction de Feulgen correctement pratiquée, le cytoplasme des mastocytes était plus ou moins coloré en rouge. La présence de structures Schiff positives en l'absence d'oxydation préalable n'en est pas moins intéressante; en effet, comme nous le verrons plus loin, elle démontre la présence de groupes aldéhydiques libres (voir paragraphe D).

c) ETUDE DE PRÉPARATIONS HISTOAUTORADIOGRAPHIQUES PROVENANT D'ANIMAUX INJECTÉS DE SULFATE RADIOACTIF ($\text{Na}_2 \text{}^{35}\text{SO}_4$) (1).

Deux rats mâles de 150 g ont reçu chacun, par voie intraveineuse, 1 500 μc de sulfate radioactif marqué au ^{35}S . On sait que ce n'est que 48 heures après l'injection de ce radioisotope que les mastocytes possèdent la radioactivité maximum (JORGES et coll., 1953; LAGUNOFF et coll., 1960). En vue d'obtenir une grande intensité de marquage, nous avons donc laissé les animaux en vie pendant 2 jours, puis nous les avons sacrifiés. Des prélèvements ont été faits dans de nombreux organes : la peau du dos, la langue, les glandes salivaires, l'estomac, l'intestin, le foie, la trachée, le poumon, la rate, le thymus, l'oreille et le testicule. Fixation à l'alcool-formol. Inclusion à la paraffine et coupes à 5 μ . Par ailleurs, des cellules péritonéales ont été recueillies par lavage et déposées sur lames comme indiqué plus haut; après séchage rapide à l'air, ces

(1) Nous avons procédé à une étude semblable chez la souris (BAECKELAND, 1966b). Ces recherches qui ont abouti à des résultats analogues à ceux obtenus chez le rat, ont été réalisées en partie pendant notre séjour au Centre de Recherches Nucléaires de Strasbourg-Cronenbourg (Section des Applications Biologiques — Directeur : Prof. J. H. VIVIEN) dans le laboratoire du Prof. Agrégé M. DEMINATTI que nous remercions vivement.

préparations ont été fixées aux vapeurs de paraformaldéhyde à 80 °C pendant 1 heure.

Certaines préparations ont été méthylées, selon le procédé de Fisher et Lillie (pendant 4 et 12 heures). D'autres préparations ont été traitées par l'hyaluronidase testiculaire à différents pH.

Dans toutes les coupes, quel que soit l'organe dont elles proviennent, nous observons, au niveau de tous les mastocytes, des grains d'argent réduits en beaucoup plus grand nombre qu'en regard de la substance fondamentale conjonctive avoisinante. Pourtant, cette dernière possède une certaine radioactivité propre, due également au sulfate injecté 48 heures auparavant. On peut s'en rendre compte si on compare la densité des grains d'argent visibles respectivement à ce niveau, au-dessus d'un épithélium (l'épiderme par exemple) et en dehors de la coupe (« back-ground »). Dans les deux derniers cas, les grains d'argent sont beaucoup plus rares qu'au niveau du tissu conjonctif.

En ce qui concerne plus particulièrement les mastocytes, l'estimation objective de la quantité de soufre radioactif incorporée est difficile; pour plusieurs raisons, il serait en effet hasardeux d'évaluer la radioactivité de mastocytes, considérés individuellement, par des comptes de grains d'argent à leur niveau ou à leur voisinage. Tout d'abord, la portion cellulaire incluse dans la coupe et la distance à laquelle elle se trouve de l'émulsion nucléaire sont variables et impossibles à connaître; en outre, comme nous venons de le voir, la radioactivité de la substance fondamentale conjonctive interfère avec celle des mastocytes.

Dans les préparations de cellules péritonéales libres déposées sur lames (fig. 12), le marquage histoaurographique est plus facile à interpréter : le rayonnement β du ^{35}S , pourtant relativement énergétique, limite ses effets perceptibles dans l'émulsion nucléaire à une surface de projection dépassant l'image du mastocyte de moins de 7 à 8 μ ; de plus, comme les espaces intercellulaires sont dépourvus de toute radioactivité et sont relativement étendus, il est possible d'évaluer avec beaucoup plus de rigueur la radioactivité des mastocytes; le comptage des grains d'argent est cependant relativement malaisé car ils sont situés à différentes hauteurs dans l'émulsion nucléaire, ce qui nécessite de nombreuses mises au point optiques au niveau de la cellule.

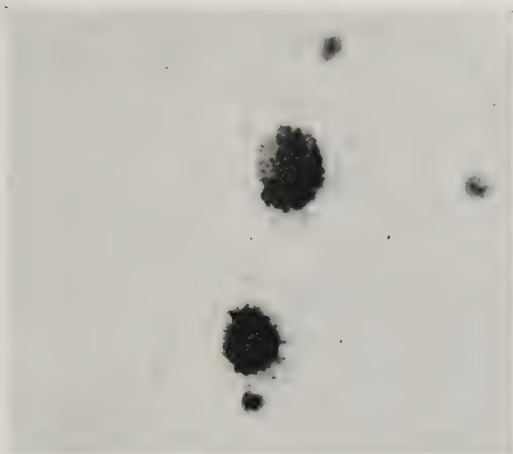


FIG. 12. Préparation histautoradiographique de cellules péritonéales d'un rat injecté de ^{35}S , 48 heures avant le sacrifice. Les mastocytes ont été mis en évidence par le bleu alcian (avec contre-coloration nucléaire au Kernechtrot). Ici, ils sont recouverts par un nuage de grains d'argent. Une importante incorporation de soufre radioactif a donc eu lieu à leur niveau (Agr. $\times 875$).

De l'examen de ces préparations, nous concluons que *tous* les mastocytes sont marqués; la radioactivité est du même ordre de grandeur pour chacun d'eux; elle paraît cependant légèrement moindre dans les plus petites de ces cellules.

Action de la « méthylation ».

Sur coupes. Si la méthylation dure 4 heures, le marquage des mastocytes est diminué de même que leur métachromasie au bleu de toluidine; la radioactivité du tissu conjonctif avoisinant a pratiquement disparu.

Après un traitement de 12 heures, tout le soufre radioactif incorporé aux tissus, et en particulier aux mastocytes, est éliminé; ces dernières cellules ne sont plus identifiables par leur métachromasie qui a totalement disparu; notons cependant que, après cette méthylation de longue durée, la basophilie tissulaire est en général affaiblie.

Dans les préparations de cellules péritonéales, l'effet de la méthylation est plus rapide et, après 4 heures de traitement

déjà, aucune substance radioactive ne peut plus être mise en évidence.

Action de l'hyaluronidase testiculaire.

Quel que soit le pH auquel elle a agi, l'hyaluronidase ne libère pas les substances marquées au ^{35}S incorporées aux mastocytes de rat. Il est cependant remarquable de constater que, notamment à pH 7,0, la radioactivité du tissu conjonctif environnant est fortement affaiblie après 4 heures de traitement par rapport à celle des coupes-contrôles. Le marquage des mastocytes est d'autant plus apparent dans ces cas.

En conclusion, une incorporation importante de ^{35}S , vraisemblablement sous la forme d'ions sulfate, a pu être observée au niveau de tous les mastocytes identifiés comme tels. On peut en déduire que la synthèse des mucopolysaccharides sulfatés, vue sous son aspect histoautoradiographique, est vraisemblablement permanente ou tout au moins qu'il n'existe pas de mastocytes qui restent au repos, de ce point de vue, pendant 48 heures. Le métabolisme propre des différents organes où nous avons reconnu les mastocytes n'influence pas cette synthèse.

L'histoautoradiographie au ^{35}S injecté sous forme de sulfate confirme donc tout à fait les données histochimiques recueillies au cours de nos expériences avec les colorants qui mettent électivement en évidence les mucopolysaccharides acides. La première méthode comme les autres déceit dans les mastocytes des mucopolysaccharides sulfatés. La présence d'autres mucopolysaccharides acides est peu vraisemblable pour la raison suivante : lorsqu'on pratique une méthylation des préparations, on note la disparition simultanée, d'une part, de la métachromasie et de la colorabilité au bleu alcian des granules mastocytaires et, d'autre part, de leur radioactivité. Ce fait est d'ailleurs en parfaite concordance avec les résultats de la saponification : après ce traitement, les mastocytes ne redeviennent ni bleu alcian positifs ni métachromatiques. Aucun groupement carboxylique n'a donc été estérifié à ce niveau.

Plus précisément, la présence d'acide hyaluronique n'a pu être démontrée dans les mastocytes. En effet, sous l'action de l'hyaluronidase testiculaire, leur radioactivité n'est pas modifiée, pas plus que les caractères tinctoriaux que nous avons étudiés.

La préparation d'hyaluronidase testiculaire que nous avons utilisée est cependant active, notamment à pH 7,0, comme le montre la diminution de la métachromasie diffuse du tissu conjonctif environnant.

B. — LES AMINES BIOGÈNES

Dès 1953, RILEY et ses collaborateurs ont établi une corrélation entre la teneur en histamine de certains tissus et leur richesse en mastocytes, notamment chez le rat. De plus, ils ont démontré qu'un traitement par diverses substances (le 48/80, par exemple) produit une dégranulation des mastocytes et libère leur histamine constitutive (voir p. 88).

En ce qui concerne la 5-hydroxytryptamine, un certain parallélisme entre les dosages de cette amine dans les tissus et les dénombrements de mastocytes n'a pu être reconnu que chez le rat et la souris (BENDITT et coll., 1955, 1963). Sa concentration dans les mastocytes péritonéaux du rat représenterait seulement le dixième ou le vingtième de celle de l'histamine (BENDITT et coll., 1955; KELLER, 1957a; CASS et coll., 1958).

De plus, on trouverait dans les mastocytes de rat de l'histidine-décarboxylase (SCHAYER, 1956, 1963; ROTHSCCHILD et SCHAYER, 1959; etc...) et de la 5-hydroxytryptophane-décarboxylase (HAGEN et LEE, 1958; SCHINDLER, 1958; LAGUNOFF et BENDITT, 1959b). Ceci indique, semble-t-il, que les mastocytes seraient capables à la fois de synthétiser et de stocker les amines.

Si la présence d'histamine et de 5-hydroxytryptamine dans les mastocytes de rat ne semble pas faire de doute, leur mise en évidence cytochimique est toutefois très difficile. Il est notamment malaisé de maintenir les amines mastocytaires *in situ*. La liaison extrêmement labile de ces amines, en particulier de l'histamine, aux structures mastocytaires est bien connue; de plus, ces substances sont très solubles dans l'eau. Pour ces deux raisons, il importe de les immobiliser immédiatement en congelant le tissu à très basse température et de déshydrater ensuite les pièces par sublimation à -30°C ou -40°C . Les tissus sont alors fixés par les vapeurs de paraformaldéhyde à 80°C pendant 1 heure (LAGUNOFF et coll., 1960b; FALCK et coll., 1962). Dans ces conditions de fixation, les amines biogènes donnent naissance à différents produits (6-hydroxy-3,4-dihydro- β -carboline pour la 5-HT par exemple) qui ensuite subissent différents phénomènes de condensation et vraisemblablement de liaison à des protéines déshydratées (JONSSON, 1967); ces produits sont alors insolubles dans les solvants organiques et dans les alcools inférieurs (FALCK et OWMAN, 1965) et ils peuvent être mis en évidence par leur fluorescence en U V (FALCK, 1962; LAGUNOFF et coll., 1962).

Dans certains cas particuliers, le traitement préalable à la fixation que nous venons d'indiquer n'est cependant pas indispensable. On peut en effet démontrer la présence d'amines dans les mastocytes de l'iris

et du mésentère du rat si, après avoir séché rapidement à l'air et à la température du laboratoire, ces tissus étalés sur lame, on les soumet à l'action des vapeurs de paraformaldéhyde à 80 °C pendant 1 heure (FALCK, 1962; ANGELAKOS, 1964). Différentes réactions de diazotation et des techniques de détection de corps réducteurs ont été également utilisées par LAGUNOFF et ses collaborateurs (1960) pour la démonstration cytochimique des amines biogènes.

a) MISE EN ÉVIDENCE D'UNE FLUORESCENCE EN UV DES MASTOCYTES DE RAT FIXÉS AUX VAPEURS DE PARAFORMALDÉHYDE.

Si de nombreux auteurs ont rapporté que les mastocytes tissulaires du rat présentent une nette fluorescence jaune-vert aux UV après fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde dans les conditions recommandées par FALCK (1962), on manquait, jusqu'il y a peu, d'informations au sujet des mastocytes qui se rencontrent normalement en tant que cellules libres dans le liquide péritonéal. Nous avons montré récemment que ces mastocytes présentent aussi une fluorescence jaune-vert en UV lorsque les préparations ont été rapidement desséchées puis fixées aux vapeurs de formaldéhyde (BAECKELAND, 1966a). Indépendamment de nous, en 1966 également, PADAWER a fait des observations semblables aux nôtres.

Technique. Les cellules péritonéales ont été recueillies de deux façons : d'une part sous forme de frottis, en mettant des lamelles au contact des anses intestinales; d'autre part, selon notre technique habituelle comportant le lavage de la cavité péritonéale par du liquide isotonique (voir Matériel et Techniques) et le dépôt sur une lamelle d'une goutte de la suspension prélevée (après dépôt des cellules sur le verre, le liquide est éliminé). Dans les deux cas, nous avons trouvé grand intérêt à accélérer le séchage de la préparation, en la plaçant sur une plaque chauffante à la température de 50 à 60 °C. Après fixation aux vapeurs de formaldéhyde à 80 °C pendant une heure, les lamelles sont immédiatement montées sur lames transparentes aux rayons ultraviolets avec, comme milieu de montage, du fluormount (E. Gurr). Les préparations sont conservées à l'obscurité et les observations sont faites dans les 24 heures suivant la fixation. Nous avons utilisé un microscope à fluorescence « Reichert » équipé d'un condensateur « fond noir » avec brûleur à vapeurs de mercure à très haute pression HBO 200 (équipement Fluorex).

Résultats. Comme pour les mastocytes mésentériques, une intense fluorescence jaune-vert est aisément décelée au niveau des mastocytes péritonéaux (fig. 13). Cette fluorescence est

limitée au cytoplasme; vers le centre de la cellule, une zone arrondie apparaît moins lumineuse, il s'agit du noyau. Dans des cas favorables et à fort grossissement, il est possible de distinguer les granules cytoplasmiques : la substance responsable de la fluorescence semble donc y être concentrée. Ajoutons que certaines préparations observées en UV ont été démontées ensuite et colorées au bleu de toluidine. De ces examens, il résulte que la très grande majorité, sinon tous les mastocytes, sont fluorescents. Ces différentes observations sont en parfait accord avec celles de PADAWER.

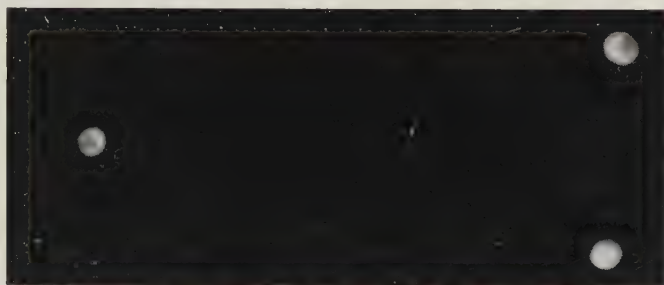


FIG. 13. Mise en évidence des mastocytes dans un prélèvement de cellules péritonéales par leur fluorescence particulière après fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde Agr. $\times 360$).

Que les mastocytes soient recueillis par frottis ou par « lavage » de la cavité péritonéale, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence en ce qui concerne leur fluorescence. Ni l'intensité, ni la longueur d'onde du rayonnement lumineux secondaire émis au niveau des mastocytes ne sont modifiées. La mise en suspension de mastocytes péritonéaux dans un liquide isotonique ne déclenche donc aucune décharge de leurs amines biogènes, du moins en ce qui concerne celles qu'on peut déceler par fluorescence. Ce résultat doit être rapproché des données fournies par les dosages biologiques des amines biogènes. Aucune fuite de celles-ci dans la phase liquide n'a pu être décelée lors de la mise en suspension des mastocytes péritonéaux (Voir Chapitre II).

Cette fluorescence jaune-vert des mastocytes est très labile. Lorsqu'on les observe pendant un certain temps à la lumière ultraviolette, l'intensité de la fluorescence décroît progressive-

ment : après 5 minutes, elle a déjà diminué; après 45 minutes, les mastocytes sont à peine perceptibles. Notons aussi que, même si on conserve les préparations à l'obscurité, il est difficile de repérer les mastocytes quand on les examine plus de 3 jours après la fixation.

Les autres éléments des préparations — même non fixés par les vapeurs de paraformaldéhyde — peuvent présenter une légère fluorescence bleue qui n'est pratiquement pas affectée par une exposition à la lumière ultraviolette. Cette fluorescence est d'ailleurs beaucoup moins intense que la fluorescence jauneverd des mastocytes et ne risque, en aucune manière, d'être confondue avec cette dernière. Par ailleurs (fig. 14), nous avons repris les observations faites sur le mésentère par FALCK et ses collaborateurs (1962) et par ANGELAKOS (1964). Cela nous a permis de comparer la fluorescence des mastocytes tissulaires et péritonéaux, qui avaient subi le même traitement (dessiccation à l'air suivie d'une fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde). L'intensité, la longueur d'onde et le caractère d'instabilité de la fluorescence nous ont paru semblables dans les deux cas.

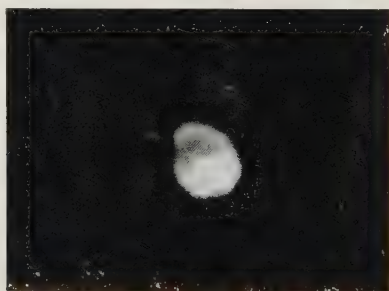


FIG. 14. *Fluorescence en UV d'un mastocyte dans du mésentère étalé, après fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde. Dans la partie supérieure de la cellule, noter la présence d'une zone grisâtre correspondant à l'emplacement du noyau (Agr. $\times$ 875).*

b) RÉACTION DE COUPLAGE AVEC LES SELS DE DIAZONIUM.

LAGUNOFF et ses collaborateurs (1960) ont obtenu, notamment par couplage avec la diazo-p-bromaniline, une réaction positive au niveau des mastocytes de tissus déshydratés par la technique du freezing-drying puis fixés aux vapeurs de paraformaldéhyde. Ces cellules se colorent en orange et se différencient nettement du fond teinté en jaune.

Quant à SCHAUER et WERLE (1959), ils affirment avoir mis en évidence l'histamine dans les mastocytes du mésentère étalé sur lame après précipitation par le sel de Reinecke, puis réaction de couplage avec la dianisidine (composé diazoïque de l'acide sulfanilique).

La recherche des amines biogènes par cette technique est raisonnable; en effet, cette réaction est donnée par tous les composés phénoliques dont l'hydroxyle phénolique est libre et dont au moins une position ortho ou para est également libre (cas de la 5-hydroxytryptamine). Le groupe imidazol réagit comme les phénols (cas de l'histamine).

Pour notre part, nous avons fixé des préparations de cellules péritonéales de deux manières : soit dans une solution aqueuse de formol à 10 % soit, après séchage à l'air, aux vapeurs de paraformaldéhyde. De plus, pour certaines d'entre elles, nous avons utilisé, en vue de précipiter l'histamine, le sel de Reinecke en solution saturée, soit pendant la fixation dans le premier cas, soit après la fixation dans les deux cas; en tout, une soixantaine de préparations sur lamelles ont été soumises à une réaction de couplage avec la diazo-p-bromoaniline ou la dianisidine (préparées et utilisées selon LISON, 1960). Quelles que soient les conditions, nous n'avons enregistré aucune réaction positive. La faible coloration jaune visible avec ces deux sels de diazonium au niveau des mastocytes était tout à fait semblable et d'intensité égale à celle observable dans les autres cellules.

C. — RECHERCHE DES LIPIDES

La littérature est pleine de contradictions à ce sujet. Certains auteurs ne sont pas parvenus à mettre les lipides en évidence dans les mastocytes (NAGAYO, 1928; WISLOCKY et DEMPSEY, 1946; NEPRIAKHIN, 1956; etc...). Pourtant, d'autres, utilisant en particulier le noir Soudan B, ont observé que les mastocytes de rat peuvent prendre ce colorant dans certaines conditions (MONTAGNA et NOBACK, 1947; PADAWER, 1963; FEAGLER et MACMANUS, 1964; etc...).

Nous avons fixé des préparations de cellules péritonéales au formol-calcium selon Baker, pendant 12 heures. Deux colorants généraux des lipides ont été employés : le rouge gras de Ciba en solution dans le propylène-glycol et le noir Soudan B en solution dans l'alcool butylique tertiaire à 35 vol. %, comme le recommandent LISON, HADLER et SAMPAIO (1960). Aucune trace de

lipide ne peut être mise en évidence dans les mastocytes péritonéaux, lorsque ces techniques sont correctement pratiquées. Nous attirons cependant l'attention sur la possibilité d'obtenir de fausses réactions positives avec le noir Soudan B. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé ce colorant en solution dans l'alcool éthylique à 70 vol. % et nous avons constaté, comme le signale d'ailleurs LISON (1960), que « l'évaporation même partielle du solvant produit des artefacts très trompeurs ». Ainsi, quand on néglige de boucher hermétiquement le flacon contenant le colorant, les granules mastocytaires sont nettement colorés en noir.

Par ailleurs, FEAGLER et MACMANUS (1964) ont observé que, dans les coupes, les mastocytes étaient faiblement colorés par le noir Soudan B. Si on les soumet à un traitement par l'acide periodique, tel que celui qui est préconisé pour la réaction au PAS, la coloration devient beaucoup plus intense. Il en est de même si on traite les coupes par l'acide acétique en solution normale.

Des préparations de cellules péritonéales ont donc été traitées par l'acide chlorhydrique ou l'acide acétique en solution normale, pendant des durées de 2 et 5 minutes. Elles ont été ensuite colorées soit par le rouge gras de Ciba, soit par le noir Soudan B. Les mastocytes ne prennent le colorant en aucun cas.

Après immersion dans l'acide acétique dilué, même pendant un temps assez bref, certaines cellules péritonéales sont capables de retenir le noir Soudan B dans leurs granules spécifiques. Il ne s'agit pas des mastocytes mais de leucocytes éosinophiles. BLOOM et WISLOCKI (1950) ainsi que RASKOVIC (1961) ont d'ailleurs démontré que les granules des éosinophiles sont constitués, pour une part, de phospholipides.

Nous avons par ailleurs tenté de mettre en évidence des éventuels phospholipides dans les mastocytes de rat. Dans ce but, nous avons procédé au test de Baker à l'hématéine acide avec contrôle par extraction à la pyridine sur des préparations fixées au liquide de Bouin. Deux séries d'essais se sont révélées négatives. L'hématéine acide ne colore nullement les granules mastocytaires.

Au cours de ces recherches, nous ne sommes donc pas parvenu à démontrer cytochimiquement la présence de lipides non masqués dans le cytoplasme des mastocytes péritonéaux de rat.

D. — MISE EN ÉVIDENCE
DE GROUPEMENTS ALDÉHYDIQUES LIBRES
ET DE CERTAINS CARACTÈRES RÉDUCTEURS

Nous avons vu au paragraphe A que lorsque l'on traite par le réactif de Schiff des coupes ou des préparations de cellules péritonéales de rat où se trouvent des mastocytes, le cytoplasme de ces derniers se colore en rouge sans qu'aucune oxydation préalable soit nécessaire (fig. 15 et 16). A notre connaissance, cette propriété n'a jamais encore été mentionnée par aucun auteur.

Le réactif de Schiff a été préparé par le procédé de COLEMAN (1938) mais sans décoloration par le charbon activé. Il n'est utilisé que 12 heures après sa préparation et est conservé dans un flacon brun à l'abri de la lumière. Aucune réaction histochimique n'a été réalisée avec une solution vieille de plus d'une semaine. Par ailleurs, le temps de traitement par le réactif de Schiff a été généralement de 15 minutes, bien qu'une réaction positive soit déjà perceptible après 5 minutes. Après le passage dans le réactif de Schiff, toutes les préparations sont plongées dans 3 bains successifs d'eau sulfureuse de 5 minutes chacun, puis mises à l'eau courante pendant 5 minutes. Montage habituel au baume. Notons enfin que toutes les préparations traitées par ce réactif ont été, au préalable, lavées soigneusement à l'eau distillée de façon à éliminer complètement tous les corps à groupes aldéhydiques éventuellement présents dans les liquides fixateurs, et notamment le formol.

Nous nous sommes efforcé de préciser les conditions de réactivité des mastocytes au réactif de Schiff et la nature du constituant en cause. Dans ce but, nous avons surtout utilisé des préparations de cellules péritonéales. Le cytoplasme des mastocytes est Schiff-positif quelles que soient les fixations histologiques que nous ayons utilisées.

Comme liquide fixateur, nous avons employé soit une solution uniquement aqueuse (liquides de Bouin, de Zenker; formol neutralisé à 10 %) soit alcoolique (alcool éthylique à 80 vol. %; alcool-formol : 4 parties d'alcool à 95 vol. % + 1 partie de formol neutralisé à 40 %; liquide de Carnoy). Durée de la fixation : en général, de 1 à 3 heures, sauf pour le liquide de Bouin dans lequel les cellules ont séjourné environ 24 heures. D'autres modes de fixation histologique ont également été employés : fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde à 80 °C pendant 1 heure ou la simple chaleur (flamme). La plupart des essais histochemiques qui seront rapportés ci-après ont cependant été faits après fixation à l'alcool-formol.

FIG. 15

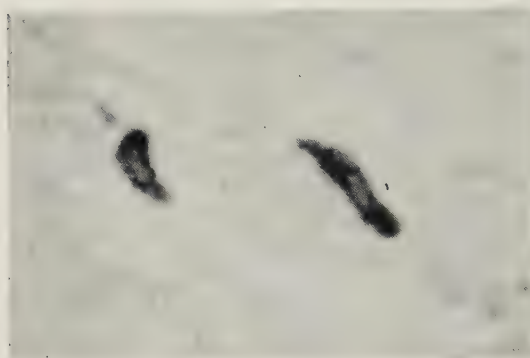


FIG. 16

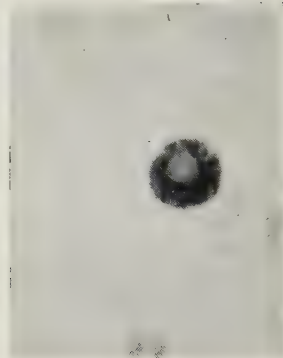


FIG. 15 et 16. Coloration du cytoplasme des mastocytes par le réactif de Schiff sans traitement préalable.

Fig. 15 (à gauche) deux mastocytes dans le tissu conjonctif sous-cutané (Agr. $\times 875$).

Fig. 16 (à droite), mastocyte du liquide péritonéal (Agr. $\times 875$).
Seuls les granules sont positifs.

Caractères de solubilité de la substance Schiff positive. Nous nous sommes tout d'abord demandé si la positivité du réactif de Schiff ne pourrait dépendre de radicaux carbonyles appartenant à des substances à caractère lipidique bien que, alors, il soit souvent nécessaire d'appliquer un traitement préalable particulier (comportant, par exemple, un passage par le sublimé dans le cas de la réaction plasmale de Feulgen et Voit).

Nous avons tenté d'extraire les lipides éventuellement présents dans les mastocytes par trois solvants différents. Des préparations fixées soit à l'alcool-formol, soit au liquide de Bouin, ont séjourné dans le xylol de 2 à 24 heures à la température du laboratoire, d'autres dans l'éther de pétrole pendant les mêmes durées et dans les mêmes conditions de température, d'autres encore ont subi l'extraction par la pyridine à 60 °C, telle qu'elle est conseillée pour le test de Baker. Dans toutes ces conditions, les granules mastocytaires ont conservé leur positivité au réactif de Schiff. Ces résultats ne constituent certainement pas un argument irréfutable contre la nature lipidique des substances Schiff positives; en effet, comme le dit LISON (1960) : « Pour l'histologiste, les caractères de solubilité des lipides n'ont pas la même importance que pour le biochimiste et il n'y attachera donc pas un intérêt exagéré ». Il n'empêche que ces constatations, jointes au fait que le cytoplasme des mastocytes ne retient pas les colorants généraux des lipides, tels que le rouge

gras de Ciba ou le noir Soudan B (voir p. 58), ne plaident pas en faveur de l'existence de corps de cette nature. Par ailleurs, des préparations fixées à l'alcool-formol ont séjourné soit de 1 à 24 heures dans l'eau distillée ordinaire soit 1 heure dans l'eau distillée à 60 °C soit 1 heure dans l'alcool éthylique à 95 vol. % à 60 °C, soit encore 1 heure dans le benzol à 60 °C. Le caractère Schiff positif des granules mastocytaires persiste. Remarquons que, dans toutes ces conditions, les réactions signalétiques des mucopolysaccharides acides, en particulier la métachromasie après coloration au bleu de toluidine, ne sont pas modifiées.

Action de l'hyaluronidase. Après fixation par l'alcool-formol, des mastocytes péritonéaux de rat ont été traités à 37 °C par de l'hyaluronidase testiculaire à la concentration de 1 mg par ml dans une solution aqueuse tamponnée. Des essais ont notamment été faits à pH 4,8 (tampon de Walpole), à pH 6,0 (tampon de Sörensen) et à pH 7,0 (tampon de Sörensen). La durée d'incubation a été le plus souvent de 14 heures, parfois de 36 heures. Nous n'avons noté aucune modification de la coloration des mastocytes par le réactif de Schiff, par rapport à celle obtenue dans des préparations-contrôle incubées dans les mêmes conditions mais en l'absence d'hyaluronidase.

Réactions de « blocage » des fonctions carbonyles. Avec les groupements aldéhydiques qui sont présents dans les matériels biologiques ou qui y ont été produits par un prétraitement, peuvent réagir différentes substances : l'hydroxylamine, le cyanure de potassium, la phénylhydrazine et le diméthylcyclohexanedione (dimédon). Nous n'insisterons pas sur les deux premières qui ne nous ont donné que des résultats négatifs : pareille absence de blocage n'a pas de signification. En effet l'aisance du « blocage » dépend beaucoup de conditions non contrôlables, en particulier de la configuration tridimensionnelle de la substance où se trouve le groupe à bloquer (Lison, 1960).

Le chlorhydrate de phénylhydrazine a été utilisé dans les conditions préconisées par LILLIE (1954) (solution aqueuse à 5 %, pendant 1 heure, à la température du laboratoire). Suite à ce traitement, il n'est plus possible de mettre les mastocytes en évidence par le réactif de Schiff. Nous sommes parvenu à obtenir un « blocage » des groupements carbonyles de ces cellules par l'emploi du dimédon en solution dans l'acide acétique

glacial; par contre, le procédé mis au point par BULMER (1959) ne nous a pas permis de supprimer la coloration des mastocytes par le réactif de Schiff.

Traitement par des oxydants : le permanganate, l'eau oxygénée, l'acide chromique. On sait qu'un traitement prolongé des polysaccharides PAS positifs par des oxydants plus énergiques que l'acide periodique, tels que le permanganate de potassium ou l'acide chromique, affaiblit la coloration des structures mises en évidence par le réactif de Schiff, en raison vraisemblablement de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. Ni le permanganate de potassium (mélange d'une solution de permanganate de potassium à 5 % et d'acide sulfurique à 5 % en parties égales; durée du traitement : 1 minute) ni l'acide chromique à 4 % pendant 2 heures, ni l'eau oxygénée à 2 vol. % pendant 30 minutes ne provoquent une diminution perceptible de l'intensité de la réaction colorée observable au niveau des mastocytes traités ensuite par le réactif de Schiff.

Mise en évidence des groupes -SH par la réaction de Chèvremont-Frederic.

En 1960, LAGUNOFF et ses collaborateurs, étudiant diverses réactions qui pourraient être en rapport avec la présence d'histamine dans les mastocytes, ont mis en évidence la présence de substances à caractère réducteur par la réaction au bleu de Prusse. Nous nous sommes demandé si cette propriété n'était pas liée à l'existence de groupes -SH. Pour résoudre ce problème, nous avons effectué la réaction de CHÈVREMONT et FREDERIC (1947) sur des préparations de cellules péritonéales fixées soit au liquide de Bouin soit au formol salé à 10 % et nous l'avons contrôlée par l'emploi d'« agents bloquants » thioloprives.

Après fixation au formol salé mais non après fixation au liquide de Bouin, la réaction a été faiblement positive au niveau du cytoplasme de tous les mastocytes. Les autres éléments du liquide péritonéal, au contraire, ne présentaient aucune coloration bleue. Comme cette réaction est donnée par différents corps réducteurs, il importe, pour identifier les groupements -SH, de traiter au préalable les préparations par différents agents éventuellement capables de les bloquer. C'est pourquoi certaines préparations ont d'abord été immergées dans une solution aqueuse d'acide mono-iodo-acétique à 4 % ou dans du sublimé à 1 % pendant des temps compris entre 5 minutes et 1 heure. Même pour les plus longs délais, ni l'acide mono-iodo-acétique

ni le sublimé ne sont parvenus à supprimer la réaction : les mastocytes sont restés légèrement colorés en bleu. Si, par ailleurs, on traite les préparations par l'acide trichloracétique, l'intensité de la coloration des mastocytes est soit à peine supérieure soit comparable à celle des mastocytes non traités.

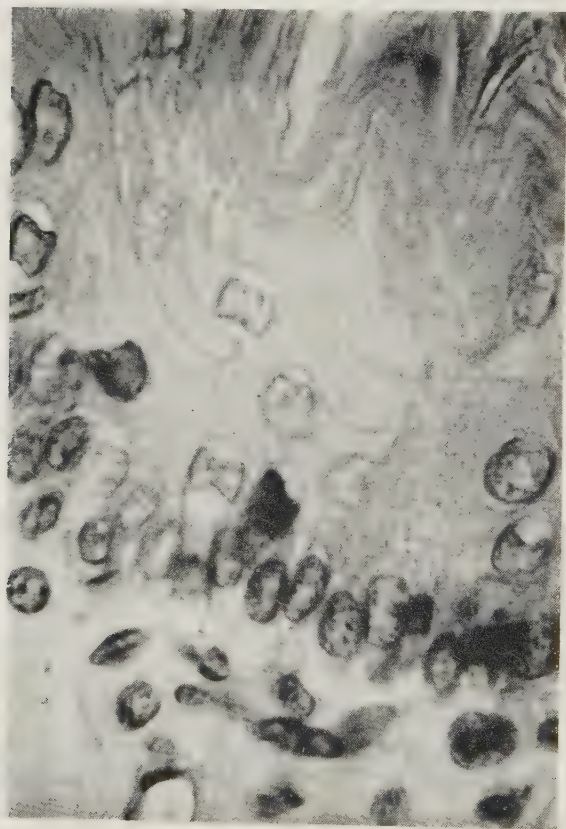
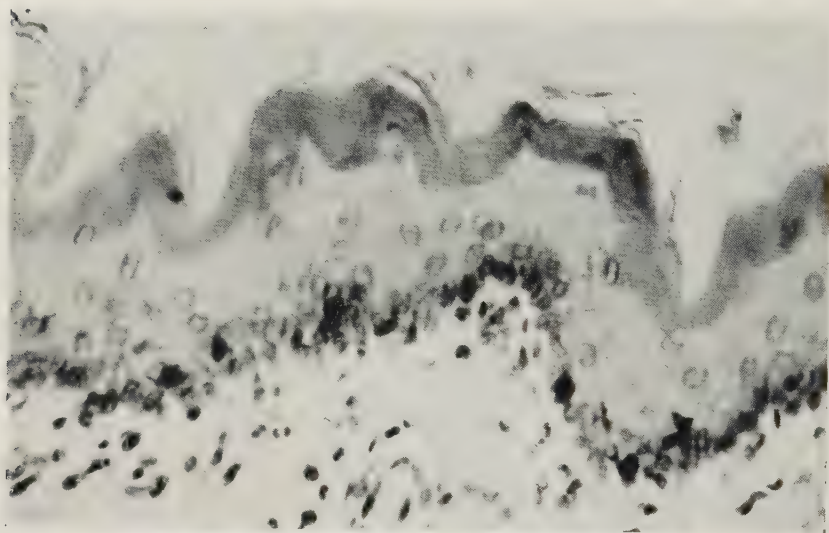
Il résulte de ces différentes expériences que le ferricyanure ferrique ne met pas en évidence des groupements $-SH$ mais d'autres corps à propriétés réductrices.

4. — DISTRIBUTION DES MASTOCYTES CHEZ LE RAT

Nous avons étudié la distribution des mastocytes chez des individus mâles ou femelles, âgés de 2 à 3 mois. Des prélèvements ont été faits dans de nombreux organes : peau (à différents niveaux : dos, oreilles, pattes, lèvres), langue, gencive, appareil digestif (œsophage, estomac, petit intestin, gros intestin, glandes salivaires, foie, pancréas), trachée, poumons, aorte, cœur, ganglion lymphatique, thymus, rate, thyroïde, parathyroïde, glande surrénale, rein, œil, organes génitaux (ovaire, pénis, testicule), mésentère et périoste. Nous avons également réalisé des étalements de mésentère et de périoste selon la technique de SELYE (1963). Il a déjà été question plus haut des mastocytes du liquide péritonéal; nous n'y reviendrons plus.

Différentes fixations ont été utilisées (voir *Matériel et Techniques*). Rappelons à ce propos que l'utilisation d'un fixateur approprié est indispensable pour mettre les mastocytes en évidence dans certaines localisations, en particulier dans l'intestin.

On peut dire qu'il existe des mastocytes dans tous les organes, même dans le rein ou le cerveau; dans ces deux cas, nous en avons trouvé de très rares, notamment aux environs de certains vaisseaux. D'une manière très générale, on peut dire qu'ils sont absents ou rares dans les parenchymes proprement dits et sont observés presque exclusivement dans les tissus conjonctifs. Ils n'existent pratiquement pas dans les tissus suivants, qui ne sont pas vascularisés ou très peu : le tissu osseux, le cartilage hyalin ou élastique (oreille, poumon, trachée), le fibro-cartilage



(pénis), le tendon (queue) et la cornée. Dans des parenchymes très vascularisés mais à stroma conjonctif réduit comme la parathyroïde ou les médullo-surrénales, ils ne sont pour ainsi dire pas présents. Les capsules de ces organes et éventuellement leurs prolongements possèdent cependant un certain nombre de mastocytes, comme d'ailleurs la plupart des tissus conjonctifs entourant les divers organes. A ce propos, remarquons que, au niveau des membranes séreuses pleurale et péritonéale, la couche sous-mésothéliale est généralement riche en mastocytes (poumon, par exemple). En coupe, leur nombre peut paraître dérisoire mais un étalement du péritoine viscéral révélerait vraisemblablement qu'ils sont aussi nombreux que dans le mésentère (voir ci-dessous).

Existe-t-il des mastocytes intra-épithéliaux ? Nous les avons recherchés, en particulier au niveau des gencives où STELLA (1955) en avait signalé l'existence dans l'espèce humaine. Nous n'en avons pas observé. Par contre, chez un petit nombre d'animaux, nous les avons vus insérés entre les cellules prismatiques du revêtement des villosités intestinales et des glandes de Lieberkühn, notamment dans le gros intestin. Une autre localisation intra-épithéliale a été décelée dans l'épithélium pluristratifié kératinisé de l'œsophage, au niveau du segment immédiatement voisin du cardia (sur 2 ou 3 mm au-dessus de celui-ci) (fig. 17 et 18). On y observe des mastocytes isolés entre les cellules épithéliales des couches non kératinisées. Sur onze prélèvements faits sur des animaux normaux, nous en avons chaque fois trouvé bien que, dans certains cas, ils soient en très petit nombre. Ils semblent généralement de taille réduite.

Si on examine systématiquement la répartition des mastocytes, on ne peut mettre ces cellules en relation avec aucune fonction propre aux différents organes.

Dans la peau (fig. 23), les mastocytes sont particulièrement nombreux dans le derme papillaire et plus profondément dans

FIG. 17 et 18. *Mastocytes intra-épithéliaux.*

FIG. 17, vue à moyen grossissement d'une coupe à travers la partie inférieure de l'œsophage proche du cardia, colorée au bleu alcian-Kernechtrot. Des mastocytes, apparaissant ici comme de petits éléments sombres et polymorphes, infiltrent la base de l'épithélium (Agr. $\times 415$).

FIG. 18, vue à plus fort grossissement de mastocytes intra-épithéliaux (Agr. $\times 920$).

le conjonctif entourant les vaisseaux, les nerfs et les follicules pileux. Ils paraissent plus fréquents en certains endroits, comme les lèvres et les paupières.

Appareil digestif. Le derme de l'épithélium épidermoïde buccal ainsi que la sous-muqueuse œsophagienne en renferment également un assez grand nombre. Signalons ici la très grande richesse de la langue en mastocytes (fig. 19 et 22). Ceux-ci ne sont pas uniquement situés dans le derme mais sont particulièrement fréquents en profondeur dans le tissu conjonctif qui accompagne les fibres musculaires. Dans la *paroi stomacale*, deux localisations différentes ont été reconnues : d'une part la sous-muqueuse et d'autre part le tissu conjonctif immédiatement sous-jacent aux cellules mucoïdes ainsi que celui séparant les glandes fundiques les unes des autres, au niveau du col. Dans l'*intestin*, les mastocytes sont peu nombreux dans la sous-muqueuse mais très abondants entre les cryptes de Lieberkühn et dans l'axe conjonctif des villosités (fig. 24). Dans le *foie* (fig. 20 et 25), ils sont loin d'être rares mais leur présence est pratiquement limitée aux travées conjonctives qui accompagnent soit les vaisseaux, soit les canaux biliaires. Aussi sont-ils beaucoup moins abondants au niveau des veines centro-lobulaires qu'au niveau des espaces stellaires de Kiernan. Dans ces derniers, ils sont situés aussi bien autour des vaisseaux qu'autour des canaux biliaires ou des petits nerfs. Dans les *glandes salivaires* ainsi que dans le *pancréas*, ils sont pratiquement absents des lobules parenchymateux. On les retrouve surtout dans les cloisons conjonctives autour des vaisseaux et des canaux excréteurs extra-lobulaires.

Au niveau de l'*appareil respiratoire*, les mastocytes ne sont pas particulièrement fréquents. On en observe un certain nombre dans la sous-muqueuse trachéale (particulièrement vers l'arrière, au niveau du muscle lisse qui joint les deux extrémités des arceaux cartilagineux). Dans le *poumon*, ils sont inexistants dans les cloisons interalvéolaires mais sont décelables dans le voisinage des bronches et bronchioles ainsi qu'autour des artères, artérioles, veines et veinules, en particulier dans l'espace lymphatique périartériel.

En ce qui concerne le *système cardio-vasculaire* (*cœur* et *gros vaisseaux* comme l'*aorte*), les mastocytes n'y sont pas particu-

FIG. 19

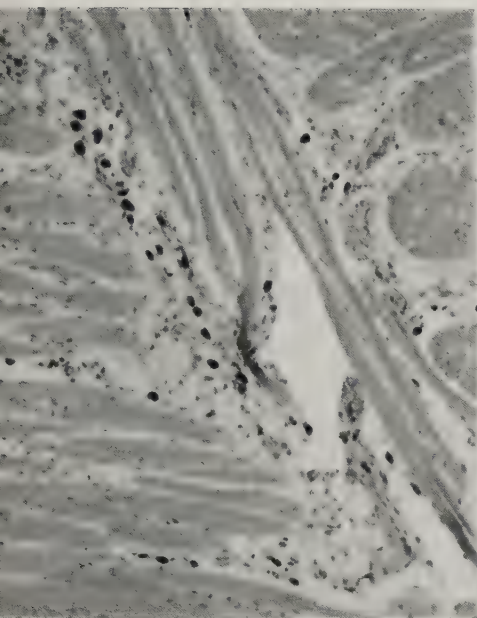


FIG. 20

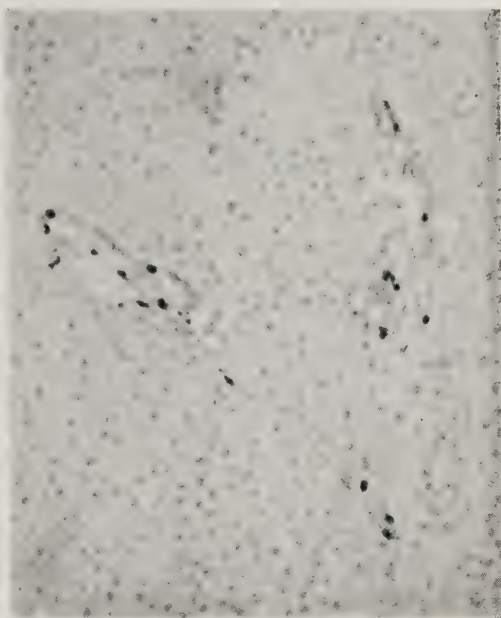


FIG. 21

FIG. 19 à 21.

FIG. 19 (en haut à gauche). *Distribution des mastocytes dans la langue de rat.* Coloration au bleu alcian-Kernechtrot. Les mastocytes sont particulièrement nombreux dans le tissu conjonctif situé entre les faisceaux de fibres musculaires (Agr. $\times 114$).

FIG. 20 (en haut et à droite). *Mastocytes dans le foie.* Même coloration. On peut voir qu'ils se localisent dans le tissu conjonctif des espaces stellaires et des cloisons interlobulaires (Agr. $\times 114$).

FIG. 21 (en bas). *Périoste étalé* (technique de SELYE, 1963). Noter l'abondance des mastocytes et la situation périvasculaire d'un certain nombre d'entre eux (Agr. $\times 114$).

FIG. 22

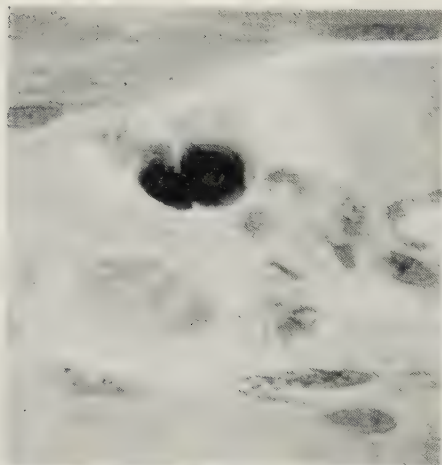


FIG. 23

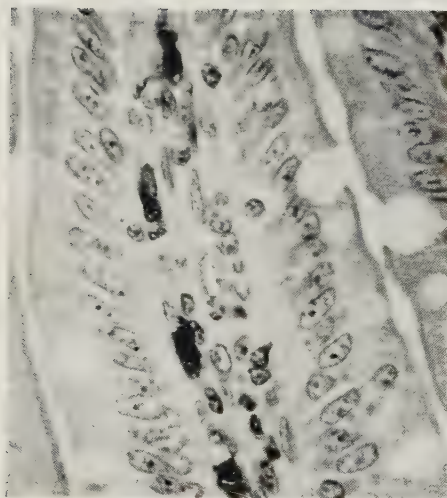
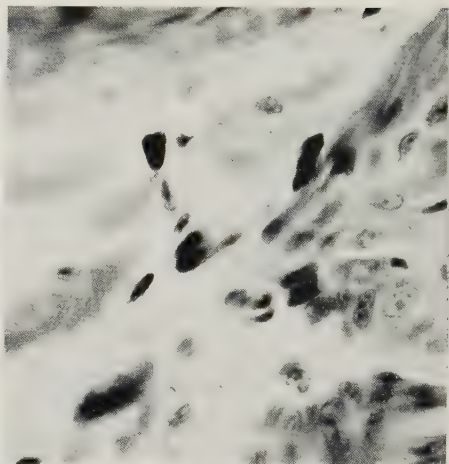


FIG. 24

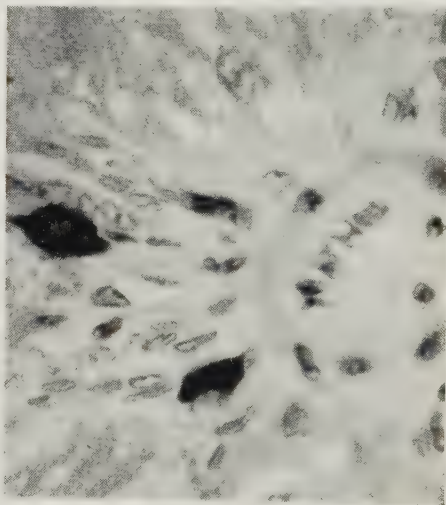


FIG. 25

FIG. 22 à 25. Aspect des mastocytes dans différentes localisations. Coloration au bleu alcian-Kernechtrot (Agr. $\times 560$).

FIG. 22 (en haut et à gauche), deux mastocytes situés dans le tissu conjonctif entre des fibres musculaires de la langue.

FIG. 23 (en haut et à droite), groupe de mastocytes dans le tissu conjonctif sous-cutané.

FIG. 24 (en bas et à gauche), quatre mastocytes dans une villosité intestinale.

FIG. 25 (en bas et à droite), mastocytes dans un espace stellaire du foie.

lièrement nombreux. Ils sont souvent situés dans les travées conjonctives du myocarde ou dans l'adventice de l'aorte. Il y en a également quelques-uns sous le péricarde.

Dans les *ganglions lymphatiques*, il y en a toujours dans la capsule mais on en observe un nombre variable à l'intérieur de cet organe. Parfois disséminés dans les travées conjonctives, ils se trouvent par groupes de 15 à 20 dans le tissu réticulé, entre les



FIG. 26. Préparation de mésentère étalé sur lame. Mise en évidence des mastocytes par le vert de méthyle après réaction de Feulgen. Le cytoplasme de ces seules cellules est apparent (en grisâtre ici). Leur localisation, à peu de distance d'un petit vaisseau, est fréquente dans cet organe (Agr. $\times 875$).

cordons médullaires. Il en est de même dans le *thymus*. Quant à la *rate*, elle est toujours très pauvre en ces cellules.

Appareil génital mâle. Les mastocytes sont très rares dans le testicule mais extrêmement nombreux sous l'épithélium du gland du pénis. Dans l'*ovaire*, il n'y en a que quelques-uns, épars aussi bien dans la médullaire que dans la corticale.

L'examen du *mésentère* (fig. 26) aussi bien que du *périorie* (fig. 21) (prélevé au niveau de la table interne de la voûte crânienne) est particulièrement instructif. Comme RILEY (1959) et SELYE et ses collaborateurs (1963), nous avons constaté que les mastocytes sont souvent rangés en files, de part et d'autre des petits vaisseaux. Généralement, ils ne sont pas en contact direct avec les structures vasculaires mais ils en sont proches. Signalons, en ce qui concerne plus particulièrement le mésentère, que les mastocytes sont très nombreux dans les « taches laiteuses » (« milk-spots ») comme WEBB (1931) l'avait déjà montré.

DISCUSSION DU CHAPITRE I

Les mastocytes, que nous avons étudiés chez le rat âgé de 2 à 3 mois, possèdent un ensemble de caractères cytologiques, cytochimiques et biologiques qui les individualise en un type cellulaire bien particulier. Leurs caractéristiques essentielles se retrouvent identiques en chacun de ces éléments, quelle que soit la localisation tissulaire. Nos recherches contredisent donc formellement les divers travaux, rappelés au début de ce chapitre, qui suggèrent la possibilité d'une certaine diversité parmi les cellules qui sont habituellement identifiées comme mastocytes.

Cependant, pris isolément, aucun de ces caractères ne suffit à identifier les mastocytes. En effet, par exemple, la coloration métachromatique de certaines inclusions cytoplasmiques peut être observées dans d'autres cellules; la mise en évidence par fluorescence d'amines biogènes intracellulaires n'est pas davantage une caractéristique exclusive des mastocytes. Ces amines se retrouvent dans certains neurones.

Nous devons donc tenter de dégager les principales caractéristiques des mastocytes du point de vue de la morphologie, de

la cytophysiologie, de la cytochimie ainsi que de la distribution. Nous confronterons nos résultats avec les données de la littérature.

Du point de vue morphologique, nos recherches ont précisé l'aspect normal du mastocyte. De nos observations en lumière ordinaire, en contraste de phase ou en contraste interférentiel (selon NOMARSKY), il résulte notamment que cette cellule est nettement délimitée, qu'elle ne contient normalement aucune vacuole cytoplasmique, avec ou sans granule, et que son noyau n'est pas pycnotique. Les granules sont très nombreux et semblent occuper tout le cytoplasme; en microscopie optique, ils se présentent comme des formations arrondies, homogènes, d'environ $0,5\ \mu$ de diamètre. En microscopie électronique, BLOOM et HAEGERMARK (1964) les ont décrits comme très denses aux électrons et limités par une membrane de $80\ \text{\AA}$. SMITH (1963a) note qu'ils peuvent être entourés d'un espace vide qui indiquerait selon lui qu'une certaine imbibition pourrait se produire au cours de la technique préparatoire à l'examen au microscope électronique; en d'autres termes, il s'agirait ici d'un artefact qui pourrait être lié à la formation de vacuoles. L'ultrastructure interne des granules est diversement décrite par les auteurs; elle serait réticulée pour les uns, vacuolaire pour les autres, fibrillaire pour d'autres encore. Certains granules seraient constitués de lamelles submicroscopiques concentriques (POLICARD et coll., 1960; HAGIHARA, 1960; BLOOM, 1960). Pour BLOOM et HAEGERMARK (1965), parmi les granules des mastocytes normaux de rat, quelques-uns seraient habituellement « altérés ». Ils seraient légèrement plus volumineux et moins denses aux électrons; leur matrice, formée d'un réseau de fins filaments, serait plus apparente que celle des granules normaux. En microscopie optique, ils correspondraient aux granules qu'on peut voir à l'intérieur des vacuoles.

Par les techniques d'examen que nous avons utilisées, il ne nous a pas été possible de démontrer, dans les mastocytes en bon état, la présence de structures cytoplasmiques autres que les granules. Notons toutefois que, dans certaines conditions où les mastocytes sont appauvris en granules, après action du 48/80 par exemple (voir fig. 28), il est possible de distinguer quelques éléments mitochondriaux dans le cytoplasme proche du noyau. De toute façon, il est certain que les mastocytes pos-

sèdent les structures cytoplasmiques habituelles telles que le chondriome et le complexe de Golgi. Ces formations ne sont pas visibles dans les mastocytes en bon état parce qu'elles sont cachées par les granules. La microscopie électronique a d'ailleurs permis de démontrer l'existence de mitochondries et d'un complexe de Golgi (ROGERS, 1956; SMITH et LEWIS, 1957; HAGIHARA, 1960; POLICARD et coll., 1960; BLOOM et HAEGERMARCK, 1965). Ces formations sont généralement situées dans une zone juxtanucléaire. SMITH (1963a) a même observé des structures ressemblant à des centrioles.

Les mastocytes ne semblent pas être des éléments en dégénérescence, comme jadis PAPPENHEIM (1902), WEIDENREICH (1908) et GRAHAM (1920) l'avaient prétendu pour les leucocytes basophiles qu'ils assimilaient aux mastocytes. Les mastocytes sont certes des cellules fragiles; ils s'altèrent rapidement tout au moins dans les conditions de survie où on les maintient pour les examiner vivants. C'est ce qui semble s'être passé au cours des observations microcinématographiques de POLICARD et COLLET (1959). Ces auteurs montrent en effet des déformations de la surface des mastocytes et des dégranulations explosives qui, selon nous, correspondent vraisemblablement à leur agonie et à leur mort. L'expulsion de granules individuels et la formation de vacuoles sont interprétées par THIÉRY (1963) comme une forme d'activité normale correspondant à un processus sécrétoire. Les conclusions que nous avons tirées de nos recherches sont en désaccord avec cette opinion. Dans les préparations fixées, il n'y a généralement pas de granule en dehors du cytoplasme des mastocytes, si la technique est correctement pratiquée. Lorsqu'une certaine dégranulation existe, elle doit être considérée comme un signe d'altération, ainsi que DEVITT et ses collaborateurs (1954), PARISH (1964) et nous-même le pensons.

* * *

Au point de vue cytophysiologique, nous nous bornerons à discuter ici les problèmes en rapport avec la motilité et la multiplication des mastocytes. En ce qui concerne l'athrocytose et la phagocytose, le lecteur voudra bien se reporter à la discussion du chapitre III.

Nous n'avons pas étudié spécialement les mouvements et les déplacements des mastocytes péritonéaux, par la technique microcinématographique par exemple, mais pendant toute la durée de nos observations et à l'examen direct, ces cellules restent tout à fait immobiles et conservent leur forme générale, alors que les macrophages et les polynucléaires éosinophiles se déplacent activement. On peut aisément s'en rendre compte en photographiant en série un même groupe de cellules repérées à plusieurs reprises au cours de l'examen. Par ailleurs, les auteurs qui ont utilisé les mêmes préparations de mastocytes que les nôtres concluent à l'absence de motilité (PADAWER, 1957), même après recours à la microcinématographie en contraste de phase (POLICARD et COLLET, 1959) et en contraste interférentiel (PADAWER, 1965).

Toutefois, lorsque les mastocytes ne sont pas isolés mais sont observés au sein des tissus, ils pourraient se déplacer très lentement. BURTON (1960) aurait pu suivre en microcinématographie des mastocytes en mouvement dans des explants de tissu sous-cutané de rat maintenus en culture. D'anciennes études d'ARNOLD (1906) sur la langue de grenouille rapportent aussi que les mastocytes seraient doués de mouvements amiboïdes que cet auteur aurait pu suivre après coloration vitale. Les conclusions de ces deux auteurs doivent cependant être acceptées sous toute réserve en raison de la grande difficulté d'identifier les mastocytes vivants au sein de ces tissus. Il est possible pourtant que les mastocytes ne soient capables de se mouvoir que lorsqu'ils se trouvent dans leur environnement naturel et disposent d'un support « solide » adéquat.

Comment expliquer en effet l'infiltration de certains épithéliums par les mastocytes si ces cellules n'étaient pas douées d'une certaine motilité ? Nous avons par ailleurs montré que, chez le cobaye, les mastocytes peuvent pénétrer à l'intérieur de caillots sanguins implantés sous la peau (BAECKELAND, 1950a). Il se peut aussi que, pour se déplacer, ces cellules doivent être sollicitées par un chimiotactisme particulier.

* * *

Au cours de nos observations chez le rat adulte normal, nous n'avons relevé aucun indice d'une différenciation ou d'une

transformation de certaines cellules en mastocytes. Quant à la multiplication de ces derniers, nos recherches histoautoradiographiques avec la thymidine tritiée ainsi que nos résultats cytophotométriques indiquent qu'ils ne se divisent pas très souvent mais qu'ils peuvent toutefois réaliser, peu fréquemment, une synthèse préprophasique d'ADN. Ces deux considérations plaident en faveur de l'existence d'une population mastocytaire stable dont les éléments auraient une vie relativement longue chez les rats de 2 à 3 mois.

Chez des animaux plus jeunes ou dans certaines conditions anormales, les mastocytes se divisent plus fréquemment. Chez les embryons de rat, on peut observer des mitoses de mastocytes (BAECKELAND, 1967). ALLEN (1962) a recherché les mastocytes en division dans le mésentère de rats de différents âges. Si, pour des individus d'un mois, l'index mitotique est de 21 ‰, il n'est que de 3,4 ‰ à 2 mois et devient extrêmement faible à 3 mois (0,2 ‰). A cet âge, le nombre de cellules ayant une teneur « tétraploïde » en ADN est très réduit (environ 1 ‰). SMITH (1963*b*) a également signalé la présence de très rares mastocytes en mitose chez le rat adulte. Par ailleurs, l'injection de thymidine à des animaux relativement jeunes permet de démontrer aisément que les mastocytes peuvent réaliser une synthèse d'ADN préparatoire à la division cellulaire (ALLEN, 1962; ASBOE-HANSEN et LEVI, 1962; ROTH et coll., 1963; WALKER et O'STEEN, 1963). C'est ainsi que ALLEN (1963) signale que, chez des animaux de 30 jours, 5 % des mastocytes sont marqués. Cet auteur insiste cependant sur le fait que ce pourcentage élevé ne s'observe que chez de jeunes rats en pleine croissance, c'est-à-dire dont le gain pondéral journalier est de 4 à 5 grammes. Il est donc normal que, dans les conditions où nous nous sommes placé, nous n'ayons vu qu'un seul mastocyte ayant incorporé de la thymidine radioactive ⁽¹⁾; le nombre de cellules conjonctives marquées y est d'ailleurs aussi très faible.

⁽¹⁾ Au cours de la rédaction de ce mémoire, nous avons eu connaissance du travail de W. K. BLENKINSOPP (1967) qui étudie la prolifération des mastocytes chez les rats adultes par la méthode histoautoradiographique après instillation continue à l'animal de thymidine tritiée pendant de nombreux jours. Les synthèses d'ADN dans les mastocytes d'animaux de poids comparable aux nôtres seraient peu fréquentes; 1 ‰ de ces cellules réaliseraient leur synthèse préprophasique d'ADN en 24 heures.

Pourtant, quand il y a destruction des mastocytes, même chez l'animal adulte, des processus mitotiques peuvent se déclencher dans les mastocytes survivants. C'est ainsi qu'un certain nombre de ces cellules en mitose peuvent être mises en évidence dans les tissus d'animaux ayant été soumis à l'action de libérateurs d'amines (HUNT et HUNT, 1957) ou à d'autres traitements (ALLEN, 1962). Si, après dégranulation et destruction d'une partie des mastocytes de rat par l'injection de 48/80, on étudie l'incorporation de thymidine tritiée au niveau de ces cellules, on constate que la proportion de mastocytes marqués atteint environ 45 ‰ aussi bien dans la langue que dans la peau, alors que chez des animaux du même âge non traités, il n'est que de 0,6 ‰ (ROTH et coll., 1963). La régénération des mastocytes après destruction d'un certain nombre de ces cellules paraît donc se faire par activation des processus mitotiques. Chez l'adulte, il s'agit, semble-t-il, du seul moyen dont dispose l'organisme pour produire de nouveaux éléments mastocytaires.

La différenciation très poussée de la cellule mastocytaire ne semble donc pas l'empêcher de se diviser. Notons qu'un autre type cellulaire aussi différencié et très riche en mucopolysaccharides est également capable de se multiplier par mitose : la cellule caliciforme de l'intestin (LEBLOND et MESSIER, 1958).

On peut s'interroger sur la signification des mastocytes binucléés que nous avons rencontrés non seulement dans le liquide péritonéal mais encore dans certains tissus. Pour ALLEN (1962) et PADAWER (1963), les mastocytes binucléés résulteraient d'une division du noyau sans cytodiérèse. PADAWER ne peut cependant exclure formellement une fusion de mastocytes mononucléés. Pour ce dernier auteur également, le volume des mastocytes binucléés serait très souvent supérieur au double du volume des mononucléés. En ce qui concerne la teneur en ADN de ces cellules, nos dosages cytophotométriques confirment les résultats d'ALLEN (1962); chacun des deux noyaux renferme la même quantité d'ADN; cette dernière correspond à la valeur « diploïde ». Notons aussi que chez des rats de 1 et de 2 mois, il existerait une relation entre l'index mitotique et l'« index de binucléation » (ALLEN, 1962).

Du point de vue cytochimique, il est maintenant possible de caractériser les mastocytes de façon précise. Comme nous l'avons indiqué, deux groupes de constituants essentiels peuvent être mis en évidence dans leur cytoplasme; d'une part des mucopolysaccharides sulfatés et d'autre part des amines biogènes. Pour l'étude des premiers, nous avons utilisé trois méthodes dont la spécificité n'est cependant pas absolue. Il est admis, par exemple, que les mucopolysaccharides acides à fonctions carboxyliques peuvent donner une coloration métachromatique après coloration par le bleu de toluidine. Quant au bleu alcian, certains auteurs prétendent qu'il pourrait déceler d'autres polysaccharides et même certaines protéines. Pourtant, selon CURRAN et KENNEDY (1955) ainsi que pour LEV et SPICER (1964), le bleu alcian utilisé à un pH très acide détecterait uniquement les mucopolysaccharides sulfatés. Dans le cas des mastocytes, ces colorations acquièrent cependant une signification beaucoup plus précise si elles sont accompagnées d'expériences-contrôle comportant des extractions préalables soit enzymatique soit chimique.

Les mastocytes restent métachromatiques au bleu de toluidine et colorables par le bleu alcian ou la fuchsine-paraldéhyde après action de l'hyaluronidase, quelle que soit la préparation utilisée. Cet enzyme ne semble donc pas attaquer les mucopolysaccharides présents dans les mastocytes. Notons toutefois que VELICAN et VELICAN (1959) auraient observé, dans certains cas, la disparition de la métachromasie des granules mastocytaires après traitement par l'hyaluronidase. Quant à la méthylation, elle supprime la métachromasie au bleu de toluidine et le caractère bleu alcian positif. Le mode d'action de la méthylation a été précisé lors d'expériences où nous l'avons associée, ainsi que la saponification, à l'histoautoradiographie à base de sulfate marqué au ^{35}S . Nous savons que, sur le vivant, ce radioisotope s'incorpore aux mucopolysaccharides sulfatés des mastocytes. Si nous traitons par méthylation une coupe provenant d'un animal injecté de radiosulfate, la radioactivité des mastocytes disparaît. Comme nous l'avons vu à la page 51, ce procédé libère en effet les radicaux sulfuriques. La méthylation, telle que nous l'avons pratiquée, supprime donc la possibilité de mettre en évidence les mucopolysaccharides acides des mastocytes par les colorants électifs en même temps qu'elle élimine les groupements sulfuriques fixés sur ces mucopolysaccharides.

Nos résultats suggèrent que l'héparine est le principal et peut-être le seul constituant mucopolysaccharidique des granules mastocytaires ⁽¹⁾. L'acide hyaluronique ne semble en tout cas pas être présent. Ces conclusions sont en parfait accord avec les données biochimiques actuelles (SCHILLER, 1963; JORPES, 1963). Signalons notamment que, selon BRIMACOMBE et WEBBER (1964) et à notre connaissance, il n'existerait aucun exemple convaincant de destruction enzymatique de l'héparine à l'exception de celle due à l'héparinase produite par la flore intestinale cultivée en présence d'héparine (GESNER et JENKIN, 1961). De toute façon, l'hyaluronidase serait incapable de dégrader, *in vitro*, des solutions d'héparine.

Le fait, observé par nous, que les mastocytes sont positifs au réactif de Schiff sans traitement préalable est assez surprenant. D'après GURR (1958), ne peuvent se colorer directement par le réactif de Schiff que certaines substances lipidiques et un constituant des fibres élastiques. Dans le cas des mastocytes, il ne doit pas s'agir de substances à caractère lipidique, car nous n'en avons pas décelé ni par les colorants généraux des lipides ni par la réaction de Baker. Il semble que cette positivité au réactif de Schiff doive être mise en rapport avec la présence de groupements aldéhydiques. Ce réactif est en effet l'un des plus sensibles et des plus spécifiques pour mettre ces groupements en évidence; en outre, les expériences de « blocage » plaident en faveur de leur présence sous forme libre au niveau des granules mastocytaires. D'après nos résultats, rien ne s'oppose même à ce que cette coloration soit en rapport avec les mucopolysaccharides sulfatés puisque, après méthylation, les mastocytes ne sont plus ni positifs au réactif de Schiff, ni métachromatiques au bleu de toluidine.

La présence de fonctions aldéhydiques pourrait aussi expliquer la réduction du ferrocyanure ferrique en bleu de Prusse, que nous avons observée au niveau des mastocytes et qui avait déjà été signalée par LAGUNOFF et ses collaborateurs (1960). Il en serait de même pour l'argyrophilie de ces cellules dans des conditions de fixation où on ne peut raisonnablement pas espé-

(1) Sur la base de nos recherches histochimiques, nous ne pouvons cependant pas exclure la présence d'acide chondroïtine-sulfurique B qui, dans l'état actuel de nos techniques, ne peut être aisément distingué de l'héparine.

rer avoir conservé les amines biogènes et en particulier la 5-hydroxytryptamine (BUÑO, 1953; COUPLAND, 1963).

En ce qui concerne la réaction au PAS, nous nous refusons, dans ces conditions, à lui accorder la moindre valeur et nous estimons que la positivité à cette réaction qui avait été signalée au niveau des mastocytes de rat (JORPES et coll., 1948; LILLIE, 1950; FEAGLER et MAC MANUS, 1964) n'a aucune signification.

Quant aux amines biogènes, mises en évidence dans les mastocytes de rat par fluorescence après fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde, il semble qu'il s'agit de 5-hydroxytryptamine. FALCK (1962) pense que l'histamine est incapable d'induire une fluorescence perceptible. PADAWER (1966) n'a d'ailleurs observé une fluorescence des mastocytes que chez les espèces où ceux-ci renferment de la 5-hydroxytryptamine, c'est-à-dire chez le rat et la souris; ils ne sont pas fluorescents chez le lapin, le hamster, le cobaye, le chat, le poulet ou la grenouille. Les conclusions de LAGUNOFF et de ses collaborateurs (1961) attribuant la fluorescence observée dans ces conditions à l'histamine, ne semblent pas reposer sur des bases solides.

Il arrive que, dans certaines circonstances et notamment au voisinage de tumeurs induites par le méthylcholanthrène, les mastocytes présentent une fluorescence en U V (COUPLAND et RILEY, 1960; FIORE-DONATI et coll., 1962; BENDITT et LAGUNOFF, 1963; SIMPSON, 1963); celle-ci n'est évidemment pas en rapport avec la présence de 5-hydroxytryptamine, la fixation utilisée au cours de ces recherches ne convenant pas pour la conservation de cette amine dans les mastocytes (BENDITT et LAGUNOFF, 1961). En réalité, on ne peut espérer visualiser la présence de 5-hydroxytryptamine dans les mastocytes que si la fixation a été faite aux vapeurs de paraformaldéhyde (FALCK, 1962).

A côté de ces substances aisément décelables par l'histochemie, le mastocyte semble renfermer d'autres constituants qui échappent actuellement à nos possibilités d'investigation ou pour lesquels les techniques dont nous disposons ne sont pas adéquates. C'est notamment le cas pour leur équipement enzymatique. On sait que les mastocytes de rat sont riches en histidine-décarboxylase et en 5-hydroxytryptophane-décarboxylase (voir page 53) mais il n'existe actuellement aucune technique histochemique pour leur démonstration. Par des techniques biochimiques, LAGUNOFF et BENDITT (1963) ont montré que les mastocytes

possèdent une activité protéasique. L'enzyme responsable de cette dernière serait homospécifique de la chymotrypsine. Toutefois, les données histochimiques sont peu claires. GOMORI a démontré en 1953 que les mastocytes disposent d'une estérase capable d'hydrolyser l'ester chloracétique de l'anilide de l'acide 3-hydroxy-2 naphthoïque (CANAS) et BENDITT et ARASE (1959) déclarent que l' α -chymotrypsine est également active sur ce substrat. Il n'empêche que la question est encore loin d'être résolue. Dans les mastocytes, on pourrait également mettre en évidence de l'aminopeptidase, des phosphatases alcaline et acide, de l'ATPase et de la β -glucuronidase (voir notamment SCHAUER, 1964).

Quelle signification donner à la présence dans les mastocytes des différentes substances que nous venons de signaler ? Remarquons tout d'abord que ces cellules semblent constituer la seule localisation de l'héparine. Cette substance n'a jamais été signalée dans d'autres cellules si ce n'est peut-être dans les leucocytes basophiles (BEHRENS et TAUBERT, 1952; MARTIN et ROKA, 1953). Déjà en 1937, HOLMGREN et WILANDER ainsi que JORPES et ses collaborateurs établissaient qu'il existe une relation constante entre le nombre des mastocytes présents dans les tissus et leur teneur en héparine.

La présence de ce mucopolysaccharide sulfaté caractérise d'autant mieux les mastocytes que sa synthèse semble être réalisée complètement par ces cellules. La structure bien particulière de l'héparine (voir BRIMACOMBE et WEBBER, 1964) interdit de penser que ce mucopolysaccharide pourrait se former à partir d'un autre polysaccharide préformé. Il est donc vraisemblable que la biosynthèse est effectuée par les mastocytes eux-mêmes. C'est d'ailleurs ce que semblent démontrer les expériences histoautoradiographiques d'incorporation du ^{35}S à l'héparine mastocytaire (ASBOE-HANSEN, 1953; GUIDOTTI, 1957; WATSON et KENNEDY, 1960; LAGUNOFF et coll., 1960).

Au contraire, les amines biogènes ne sont pas toujours renfermées dans les mastocytes; elles peuvent être identifiées en beaucoup d'autres localisations : l'histamine est présente notamment dans les plaquettes sanguines de certaines espèces, dont le lapin (SCHAYER et KOBAYASHI, 1956); la 5-hydroxytryptamine est abondante dans certaines régions du système nerveux central ainsi que dans les cellules chromaffines de l'intestin.

L'origine des amines décelées dans les mastocytes est encore discutée. Pour certains, elles pourraient provenir d'une synthèse réalisée par les mastocytes eux-mêmes (pour l'histamine, SCHAYER, 1956; ROTHSCHILD et SCHAYER, 1959; pour la 5 hydroxytryptamine; LAGUNOFF et coll., 1957). KAHLSON et ses collaborateurs (1964) n'ont cependant trouvé dans certaines conditions expérimentales aucune corrélation entre l'élévation de l'activité histamino-formatrice et le nombre de mastocytes tissulaires. De toute façon, de nombreux autres tissus sont riches en histidine-décarboxylase (WERLE et LORENZ, 1966). De plus, la captation d'amines d'origine exogène par les mastocytes de rat semble être possible (FURANO et GREEN, 1964).

Sans préjuger du rôle joué par chacun des principaux constituants des mastocytes, il semble que la présence d'héparine est, dans l'état actuel de nos connaissances et du point de vue cytochimique, la caractéristique par excellence de ces cellules. Elle est celle qui, chez l'animal normal, les distingue le mieux des autres types cellulaires.

* * *

La distribution des mastocytes chez le rat a fait l'objet de très nombreuses observations. Dans la plupart des cas, il ne s'agit cependant pas d'études systématiques. En outre, les résultats sont parfois contradictoires. Citons un exemple particulièrement édifiant : si HUNT et HUNT (1956) signalent que dans l'intestin du rat, les mastocytes sont très abondants entre les glandes de Lieberkühn et dans l'axe conjonctif des villosités, MOTA et ses collaborateurs (1956) déclarent qu'ils en sont pratiquement absents. Pour notre part, nous avons constaté que leur nombre y était toujours élevé. Ces mastocytes sont cependant plus difficiles à mettre en évidence que ceux que l'on trouve dans la sous-muqueuse de l'intestin. Ces derniers sont encore visibles même après fixation au formol à 4 % alors que les premiers ne peuvent être décelés qu'après une fixation dans un liquide alcoolique, de préférence à base d'acétate basique de plomb (voir *Matériel et Techniques*) (1). Il importe donc, pour

(1) On ne peut pas tirer argument du fait que la fixation des mastocytes dans les diverses localisations est plus ou moins aisée pour conclure que certains de leurs constituants seraient différents d'une cellule à l'autre; nous pensons, en effet, que la nature et la constitution des tissus, dans lesquels ils se trouvent, peuvent influencer fortement leur fixation.

étudier la distribution de ces cellules, de les rechercher dans un matériel judicieusement préparé.

D'un point de vue très général, on peut dire que les mastocytes se localisent principalement dans des tissus conjonctifs vascularisés ainsi que dans les liquides pleural et péritonéal. Des mastocytes intra-épithéliaux ont cependant été observés en divers endroits : la gencive humaine (STELLA, 1955), l'œsophage et le vagin du chat ainsi que du macaque (ZWILLENBERG, 1958). Plus spécialement chez le rat, HARDY et WESBROOK (1895) ont signalé la présence de mastocytes dans l'épithélium intestinal d'animaux exclusivement nourris de viande fraîche. Pour notre part, nous avons constaté cette dernière localisation même chez des rats recevant une alimentation standard; de plus, nous avons montré que dans l'œsophage, ils se retrouvent régulièrement dans l'épithélium pluristratifié situé immédiatement au-dessus du cardia.

En certains endroits, et notamment dans le mésentère ou le périoste étalés, nous avons observé que la répartition des mastocytes est en relation avec le système vasculaire de ces organes. Dès 1933, QUENSEL avait indiqué qu'ils se trouvaient principalement autour des petits vaisseaux à paroi mince, peu musclée. Dans sa monographie, RILEY (1959) insiste sur cette disposition mais il est d'avis que leur présence est en rapport avec le conjonctif périvasculaire plutôt qu'avec le contenu des vaisseaux. Le bien-fondé de cette opinion semble confirmé par le fait que les mastocytes ne se localisent pas seulement autour des vaisseaux mais aussi autour des nerfs et des conduites glandulaires; comme les vaisseaux, ces structures sont également entourées d'un tissu conjonctif lâche comparable au tissu adventiciel.

D'une manière générale, nous n'avons pas tenté d'estimer de façon précise les variations du nombre des mastocytes tissulaires à un endroit donné. Les résultats des dénombrements à faire pour mettre ces modifications en évidence sont souvent malaisés à interpréter. Voici les principales difficultés de pareil travail. La distribution des mastocytes tissulaires est généralement hétérogène; comme nous venons de le voir, ils se groupent souvent à peu de distance des vaisseaux, des nerfs, des canaux excréteurs, etc... Par ailleurs, dans une même localisation, il existe des différences individuelles importantes (même entre

rats-frères). De plus, certaines conditions particulières peuvent introduire de graves erreurs dans les résultats, notamment l'œdème tissulaire. Bref, comme le fait remarquer PADAWER (1963), les études quantitatives précises sur la répartition des mastocytes dans les tissus se heurtent à des difficultés presque insurmontables. Dans ces conditions, nous pensons que vouloir apprécier des modifications peu importantes du nombre de mastocytes est un leurre.

Les mastocytes des liquides péritonéaux ou pleuraux constituent un cas particulier. En effet, le milieu étant liquide, il est possible de prélever des échantillons représentatifs de l'ensemble de cette population cellulaire; de plus, comme nous venons de le voir, les mastocytes y sont nombreux.

Au cours de nos recherches, nous avons constaté une augmentation relativement considérable du nombre de mastocytes péritonéaux après injection intraveineuse préalable soit d'héparine soit de sulfate de soude (voir *Matériel et Techniques*). Tout se passe comme si le liquide péritonéal s'enrichissait uniquement en mastocytes. La brièveté des délais nécessaires à cette élévation du nombre de mastocytes exclut la possibilité d'une multiplication — dont nous n'avons d'ailleurs aucune preuve cytologique —. Ces expériences suggèrent donc que des mastocytes tissulaires, en particulier mésentériques, se « libèrent » et passent dans le liquide péritonéal en tant que cellules libres.

Dans certaines circonstances, l'augmentation du nombre de mastocytes est parfois tellement considérable qu'elle ne peut passer inaperçue. Ces cellules sont très nombreuses autour d'un foyer hémorragique (GEREBTZOFF cité par BAECKELAND, 1950a) ou dans le derme et le conjonctif sous-cutané de la peau, aux environs de l'endroit d'implantation d'un caillots sanguin (BAECKELAND, 1950a; HISSARD et coll., 1953). Lorsqu'on induit des tumeurs, notamment par application de méthylcholanthrène sur la peau, on note également beaucoup de mastocytes dans le tissu conjonctif sous-jacent (CRAMER et SIMPSON, 1944; RILEY, 1958; CSABA et coll., 1961; SIMPSON et coll., 1962).

* * *

Après avoir fait la synthèse de nos connaissances sur la répartition des mastocytes dans les tissus, il faut rechercher

si les conclusions qui se dégagent de cette étude permettent de rattacher la présence des mastocytes à une fonction bien définie. A priori, on peut admettre que la distribution des mastocytes serait en relation avec la fonction qu'ils exercent dans l'organisme.

C'est la présence régulière de mastocytes dans certains épithéliums, entre autres dans celui qui revêt l'œsophage près du cardia, qui, en premier lieu, a retenu notre attention. Comme on le sait, les tissus épithéliaux, à l'encontre de la plupart des tissus conjonctifs, ne sont pas vascularisés mais sont nourris par imbibition; il n'y existe pas de fibres, ni collagènes ni réticulées ni élastiques; les constituants extra-cellulaires sont très peu abondants entre les cellules qui constituent à elles seules la plus grande partie du tissu.

Par conséquent, il est difficile d'admettre que les mastocytes jouent un rôle dans la régulation de la vascularisation locale des tissus. Par ailleurs, il serait très discutable d'envisager l'intervention de ces cellules dans l'une ou l'autre fibrillogénèse, comme l'avaient fait BENSLEY (1949), MORRIONE (1952), MACDOUGAL (1954) ou REILLY et ses collaborateurs (1955). Comme nous venons de le rappeler, le liquide interstitiel est en général peu abondant entre les cellules épithéliales. Dans le cas particulier de l'épithélium de revêtement de l'œsophage, on peut cependant se demander si les forces mécaniques qui le distendent lors du passage du bol alimentaire, combinées à un reflux partiel du contenu gastrique dont le caractère acide est bien connu, n'engendreraient pas à ce niveau une formation accrue de lymphé tissulaire. A cet endroit, il est possible que l'existence de mastocytes doive alors être mise en rapport avec la présence d'un liquide intercellulaire plus abondant que dans la plupart des autres épithéliums de recouvrement. Peut-être aussi, à ce niveau, la constitution du liquide interstitiel est-elle proche de celle du liquide que l'on rencontre normalement dans le tissu conjonctif.

Un second point intéressant à considérer si nous voulons établir des relations entre la distribution des mastocytes et leur fonction, est leur localisation à proximité des vaisseaux. Diverses hypothèses ont déjà été émises à ce sujet. Pour HOLMGREN (1937), l'héparine qui serait sécrétée par les mastocytes agirait par son pouvoir anticoagulant en prévenant les thromboses. Pour

McGOVERN (1956), la perméabilité capillaire dépendrait d'un «spreading factor» produit par les mastocytes; ce facteur exercerait son action sur la couche protéique qui recouvre les cellules endothéliales ou sur la substance cimentante argyrophile qui joint ces cellules. D'autres auteurs (WEST, 1958; KELSALL et CRABB, 1959) pensent que, grâce à leur grande richesse en substances vaso-actives (histamine, 5-hydroxytryptamine), les mastocytes seraient capables de modifier la circulation dans les capillaires ainsi que la perméabilité de la paroi de ces derniers en fonction des conditions locales existantes. Bien qu'on n'ait encore apporté aucune preuve expérimentale d'un tel rôle, remarquons que la situation des mastocytes au voisinage de certains vaisseaux serait bien adaptée à cette fonction. Ils pourraient ainsi contrôler la constitution de la substance fondamentale conjonctive, notamment en protéines d'origine sanguine. Dans ce même ordre d'idées, ASBOE-HANSEN et WEGELIUS (1957) pensent que ces cellules peuvent être à la base de certains phénomènes œdémateux. Il faut cependant remarquer que l'hypothèse formulée par ces auteurs d'une sécrétion d'acide hyaluronique par les mastocytes en plus de celle des amines, ne semble pas correspondre à la réalité (JORPES, 1963).

Les arguments développés à l'appui de ces théories ne sont guère convaincants. Rappelons que l'on n'est jamais parvenu à déceler de l'héparine dans le sang circulant chez le rat, même lorsqu'on détruit la population mastocytaire par des moyens pharmacodynamiques (RILEY, 1959). Les autres hypothèses admettent un contrôle de la perméabilité de la paroi vasculaire par les mastocytes. Mais quelle signification attribuer alors aux localisations intraépithéliales de ces cellules ?

Bref, on ne relève à l'appui de ces différentes théories aucun argument péremptoire qui permettrait de rattacher aux structures vasculaires proprement dites ou à leur contenu, la présence des mastocytes à proximité des capillaires et des petits vaisseaux. Comme nous l'avons dit plus haut, il semble, d'une manière générale, que les mastocytes se localisent principalement dans des tissus conjonctifs n'ayant pas de fonction mécanique particulière mais assurant une liaison lâche entre des structures diverses : vaisseaux, canaux excréteurs, nerfs, masses parenchymateuses, etc..., et les éléments voisins.

Quelles pourraient être les raisons qui déterminent la localisation des mastocytes dans ces tissus conjonctifs ? A leur niveau, se manifestent certainement les effets des compressions, tractions, tiraillements, etc..., qui sollicitent les organes voisins et augmentent vraisemblablement, dans une certaine mesure, le flux de lymphe interstitielle. A titre d'hypothèse, on peut dès lors concevoir que la présence des mastocytes serait liée, d'une manière ou d'une autre, aux voies de cheminement non structurées des liquides intercellulaires dans les tissus. Ainsi s'expliquerait la localisation des mastocytes, habituelle dans les tissus conjonctifs, exceptionnelle dans les tissus épithéliaux.

Par ailleurs, dans les observations faites au sujet de la distribution de ces cellules, rien ne semble s'opposer à une telle conception de leur rôle. Au contraire, on peut justifier ainsi, dans une certaine mesure, leur présence ou leur absence en divers endroits. Ils sont abondants dans les liquides qui se trouvent dans les cavités péritonéale et pleurale et qui peuvent être rapprochés, à certains points de vue, de la lymphe interstitielle. De plus, on les trouve en nombre particulièrement élevé aux alentours des vaisseaux, source de ces liquides interstitiels. Enfin, il n'existe généralement pas de mastocytes dans les tissus très denses et très fibreux, là où la circulation sanguine est réduite et où on ne distingue pas de zones de tissus conjonctifs lâches qui pourraient être des voies de cheminement pour les liquides extravasculaires (comme par exemple, la cornée, le tendon, le cartilage).

RÉSUMÉ DU CHAPITRE I

Nous avons procédé à une étude cytologique, cytophysiologique et cytochimique des mastocytes de rats âgés de 2 à 3 mois. La distribution de ces cellules dans les différents organes a également fait l'objet d'une étude détaillée.

1. Nos recherches morphologiques sur le vivant ont surtout consisté en l'observation de mastocytes péritonéaux maintenus en survie entre lame et lamelle. Nous avons procédé à de nombreux examens à fort grossissement en lumière ordinaire, en

contraste de phase et en contraste interférentiel selon Nomarski. Nous avons montré que différentes formations observées au niveau de ces cellules, notamment les vacuoles cytoplasmiques, ne correspondent pas à des manifestations d'activité normale mais témoignent au contraire d'une lésion cellulaire. Des observations ont été effectuées également sur des préparations fixées; quand on utilise des liquides fixateurs non adéquats, on observe parfois diverses images inhabituelles, comme celle de la présence de granules à l'extérieur des mastocytes; ces images doivent être considérées comme des artefacts.

2. Du point de vue cytophysiologique, nos recherches démontrent tout d'abord que les mastocytes sont dès éléments peu ou pas mobiles dans les circonstances normales, ne possédant pas de propriétés biologiques comparables à celles des cellules histiocytaires, comme le pouvoir d'athrocyter par exemple. Chez l'adulte, l'activité mitotique des mastocytes est très faible; par ailleurs, nous n'avons mis en évidence aucun phénomène de transformation d'autres cellules en mastocytes. Chez l'individu normal, il semble s'agir d'une population cellulaire extrêmement stable se renouvelant très peu.

3. Nous avons aussi réalisé une étude cytochimique des constituants essentiels des mastocytes, mucopolysaccharides sulfatés et amines notamment. Elle nous a permis de conclure que les mastocytes normaux de rat adulte constituent une population homogène de cellules renfermant des substances dont la nature semble analogue d'un mastocyte à l'autre, quelle que soit la localisation de ces cellules (héparine et 5-hydroxytryptamine notamment). Signalons également qu'au cours de nos travaux, nous avons montré que leur matériel cytoplasmique granulaire présente une réaction Schiff positive sans qu'une oxydation préalable soit requise. La présence à ce niveau de groupements aldéhydiques libres est discutée.

4. Notre étude de la distribution conclut à la présence *habituelle* des mastocytes dans le tissu conjonctif lâche; ils sont fréquemment situés à proximité des capillaires et des petits vaisseaux sanguins. Ils seraient en relation avec certaines voies de cheminement non structurées du liquide interstitiel dans la

substance fondamentale. Nous avons également établi que les mastocytes peuvent se rencontrer dans certains tissus épithéliaux de revêtement (au niveau de l'œsophage, de l'intestin grêle, par exemple).

CHAPITRE II

ACTION DES AMINO-LIBÉRATEURS ET DE LA RÉSERPINE SUR LES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX

L'histamine et la 5-hydroxytryptamine peuvent quitter les mastocytes et gagner les liquides interstitiels voisins sous l'action de nombreux agents : 48/80 ⁽¹⁾, dextran, protamine, etc. Nous appellerons ces agents des amino-libérateurs ⁽²⁾. Lorsqu'il y a libération de ces amines biogènes en quantité importante, on observe, au niveau des mastocytes, des modifications morphologiques que les auteurs appellent généralement « dégranulation » ou « éclatement ».

D'un point de vue cytologique, nous possédons relativement peu de renseignements sur ces modifications ou lésions. Les mastocytes dégranulés ont surtout été décrits dans des préparations fixées puis colorées au bleu de toluidine (RILEY, 1953*b*; FAWCETT, 1954; GUSTAFSSON et CRONBERG, 1957; etc.) ce qui ne permet pas un examen cytologique suffisamment précis. Quelques autres indications nous sont fournies par la microscopie électronique (SMITH et LEWIS, 1957; WELSCH et GEER, 1959; BLOOM et HAEGERMARCK, 1965). Les conclusions des observations effectuées ainsi sont cependant extrêmement difficiles à tirer : comme le fait remarquer SMITH (1963*a*), il est habituel de constater, au microscope électronique, même chez les animaux nor-

(1) Produit de condensation de la *p*-méthoxyphénéthylamine avec le formol.

(2) Selon LECOMTE (1966), on peut considérer comme amino-libératrice toute substance qui est capable, chez le rat, de faire passer simultanément l'histamine et la 5-hydroxytryptamine endogènes sous forme libre, pharmacodynamiquement active. Nous adoptons cette façon de voir; en d'autres termes, est amino-libérateur tout agent entraînant le passage hors de la cellule, de l'histamine et de la 5-hydroxytryptamine liées à un substrat tels les grains de mastocytes.

maux, des images de fixation défectueuse uniquement au niveau des mastocytes alors que, par ailleurs, tous les autres éléments de la préparation sont excellemment fixés.

De toute façon, l'étude des modifications morphologiques accompagnant la libération des amines ne sera complète que si on peut suivre ces altérations dans le temps. Il est alors indispensable de recourir à des examens sur le vivant dans de bonnes conditions. Jusqu'à présent, l'observation directe, associée parfois à la microcinématographie, du phénomène de dégranulation a été surtout réalisée sur des mastocytes non isolés, au sein d'un tissu conjonctif plus ou moins abondant (SMITH, 1958; DOUGHERTY et SCHNEEBELI, 1958; SMITH et coll., 1960).

Pour retirer le maximum d'informations d'une telle étude, il faut pratiquer ces examens sur un matériel qui permet de se placer dans les conditions optiques les meilleures. C'est pour cette raison que nous avons choisi les mastocytes libres du liquide péritonéal que l'on peut maintenir en survie quelques heures en bon état; ces cellules peuvent en effet être aisément observées vivantes en contraste de phase et à fort grossissement (voir chapitre I, p. 27).

Les recherches qui ont été effectuées de cette façon sont rares et le plus souvent occasionnelles (ZOLLINGER, 1950; POLICARD et COLLET, 1959; UVNÄS, 1963). Par ailleurs, aucune comparaison entre les différents agents libérateurs d'amines, sur la base des modifications morphologiques qu'ils produisent, ne semble avoir jamais été faite. SMITH et ses collaborateurs (1960) admettent bien que la succession et l'importance des changements provoqués par les libérateurs d'amines sont spécifiques pour chaque agent pharmacodynamique considéré; toutefois, la grande majorité des auteurs ne font aucune différence entre les diverses lésions cytologiquement décelables au niveau des mastocytes. Ils englobent toutes ces atteintes sous le vocable général de « dégranulation ».

Quant à la cytochimie des mastocytes traités par les divers amino-libérateurs, elle n'a guère non plus jusqu'à présent retenu l'attention.

Bref, si les recherches pharmacodynamiques sur la libération des amines mastocytaires sont très nombreuses, les observations morphologiques et cytochimiques de mastocytes soumis à l'action d'amino-libérateurs sont rares.

Une étude comparative de l'effet sur les mastocytes de différentes substances possédant des propriétés amino-libératrices s'impose. Nous l'avons entreprise. Nos recherches comporteront tout d'abord des examens en contraste de phase, à fort grossissement, de mastocytes péritonéaux libres placés entre lame et lamelle. Ces examens seront complétés par une analyse cytochimique et parfois, quand les données de la littérature sont inexistantes ou trop fragmentaires, nous étudierons la libération d'histamine elle-même par des dosages biologiques.

Parmi les libérateurs d'amines, notre choix s'est d'abord porté sur des substances bien connues, dont le mécanisme d'action a fait l'objet de nombreuses publications, telles le 48/80 et le 1935 L ⁽¹⁾. Nous avons utilisé aussi une substance qui possède non seulement des propriétés amino-libératrices comme les précédentes, mais qui a aussi la capacité de neutraliser l'héparine aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* : il s'agit du *polybrène* ⁽²⁾, produit de synthèse que nous avons retenu de préférence à la protamine. Par ailleurs, la mise en contact des mastocytes avec de l'eau distillée ou avec des solutions hypotoniques non seulement provoque des lésions irréversibles, comme dans toutes les cellules vivantes, mais encore libère les amines renfermées dans ces cellules sans autre intervention pharmacodynamique (FAWCETT, 1954, 1955; KELLER et BURKARD, 1956; ARCHER, 1959). Les lésions sont-elles alors analogues à celles provoquées par les agents chimiques cités plus haut ?

Un autre problème nous a également préoccupé : des substances comme les dextrans, libératrices d'amines chez l'animal, ne semblent pas produire d'altérations morphologiques grossières *in vitro*, à moins qu'il n'y ait du sérum frais dans le milieu (BAECKELAND, 1964); on peut se demander si les mastocytes soumis au seul dextran ne présentent cependant pas des altérations de leur cytologie fine et de leur cytochimie normale. Nous avons également étudié les effets produits sur les mastocytes par certains échantillons de sérum frais.

Par ailleurs, étant donné que d'une part les mastocytes de rat renferment de la 5-hydroxytryptamine (BENDITT et coll., 1956;

(1) Il s'agit d'un mélange équimoléculaire de 4-4' oxyphényl 4-4' « oxy 3 » méthyl phényl butylamine-2 et de sa forme déshydrogénée.

(2) Bromure d'hexadiméthrine synthétisé par les laboratoires Abbott (Chicago U. S. A.). Poids moléculaire moyen : 6 000.

KELLER, 1957a; CASS et coll., 1958) et que d'autre part la teneur de certains tissus en cette dernière peut être électivement réduite par des substances extraites du *Rauwolfia* (SHORE et coll., 1955), nous avons estimé qu'il était nécessaire de rechercher les effets de la réserpine sur les mastocytes.

1. — DESCRIPTION DES EFFETS CELLULAIRES DES AMINO-LIBÉRATEURS

Nos observations cytologiques ont été faites à fort grossissement et en contraste de phase dans des conditions analogues à celles que nous avons réalisées pour l'examen de mastocytes non traités (voir p. 27).

Comme pour ces observations, des mastocytes péritonéaux sont récoltés par lavage de la cavité péritonéale et une goutte de cette suspension est déposée sur une lame ou sur une lamelle. Ces préparations de cellules péritonéales sont généralement scellées à la paraffine sur une lame creuse et maintenues à 37 °C pendant un certain temps. Quand les cellules adhèrent suffisamment au verre et commencent à s'étaler à son contact, la préparation est déscellée et soumise à l'expérimentation. L'examen microscopique entre lame et lamelle suit immédiatement, à la température du laboratoire ou parfois sur platine chauffante à 37 °C. Les libérateurs chimiques d'histamine ont été ajoutés en solution dans une goutte de liquide de Hanks sans bicarbonate.

A. — LE 48/80

Ce libérateur a été employé à la concentration finale de 1 et de 5 μ g par ml. Avant de décrire les lésions provoquées par le 48/80, disons que tous les mastocytes sont lésés et qu'il n'est plus possible d'en trouver dans la préparation un seul qui soit intact.

Même en présence de la plus faible concentration utilisée, les lésions apparaissent très rapidement. A la température du laboratoire, le temps de latence est extrêmement bref si bien que, dès le début de l'examen microscopique en contraste de phase, la plupart des mastocytes présentent déjà des altérations. Des granules se trouvent déjà à l'extérieur du cytoplasme, parfois en grand nombre, parfois en petit nombre. Ces granules ont été

projetés dans le milieu extérieur à une distance qui n'excède pas la moitié du diamètre de la cellule, soit 6 à 7 μ . On peut d'ailleurs suivre l'éjection de certains d'entre eux : il s'agit d'un processus rapide et, même à la température du laboratoire, c'est en une fraction de seconde que le granule mastocytaire passe du cytoplasme à l'extérieur de la cellule. Au début du phénomène, des granules isolés quittent la cellule et, à ce moment, la limite cellulaire est encore tout à fait nette. Ensuite, les granules mastocytaires s'épandent à l'extérieur de la cellule en groupes plus ou moins importants; la limite cellulaire n'est plus bien définie, en sorte que le mastocyte éclaté apparaît constitué par un noyau, relativement bien visible et semblant en bon état, entouré d'un gros amas de granules. A la faveur du moindre courant liquide qui se développe dans le milieu extracellulaire, des granules situés à la périphérie ainsi que des débris cytoplasmiques se détachent et sont emportés loin des mastocytes dont ils proviennent (fig. 27 et 28). Un certain nombre de granules semblent cependant conglomérés autour du noyau dans une substance qui représente vraisemblablement les restes du cytoplasme intergranulaire. La quantité de granules qu'on y dénombre est évidemment de loin inférieure à celle qu'on trouve dans un mastocyte en bon état; de plus, dans de nombreux cas, on a l'impression qu'entre ces granules, on peut discerner de petites vacuoles claires qui correspondent peut-être à l'emplacement où se trouvaient les granules éjectés. Au fur et à mesure que l'observation se poursuit, les granules eux-mêmes, qu'il s'agisse de ceux répandus dans le milieu intercellulaire ou de ceux qui restent autour du noyau des mastocytes, paraissent augmenter de volume. Si, après 15 minutes, un petit nombre de ces granules sont à peine plus volumineux que ceux des mastocytes normaux, d'autres par contre peuvent atteindre un diamètre double ou même triple.

Afin de suivre les premières phases de l'action du 48/80, nous avons répété cette expérience dans des flacons de Carrel, sur des cellules péritonéales fraîchement explantées et n'ayant pas été mises en présence de sérum. De cette manière, il nous a été beaucoup plus aisé de procéder sans interruption à nos observations et de rechercher les modifications morphologiques des mastocytes, dès l'introduction du libérateur d'histamine dans le milieu. Pour la concentration de 5 μg par ml de 48/80 et à une température proche de 37 °C, nous avons observé, en lumière ordinaire et à moyen grossissement, un effet quasi instantané de ce

libérateur d'histamine sur les mastocytes. Il se manifeste d'abord par un léger gonflement de la cellule puis par une augmentation sensible de sa réfringence suivie très rapidement par l'expulsion de granules cytoplasmiques. A la température du laboratoire, ces modifications se produisent plus lentement mais débutent cependant après 2 à 3 secondes.

FIG. 27

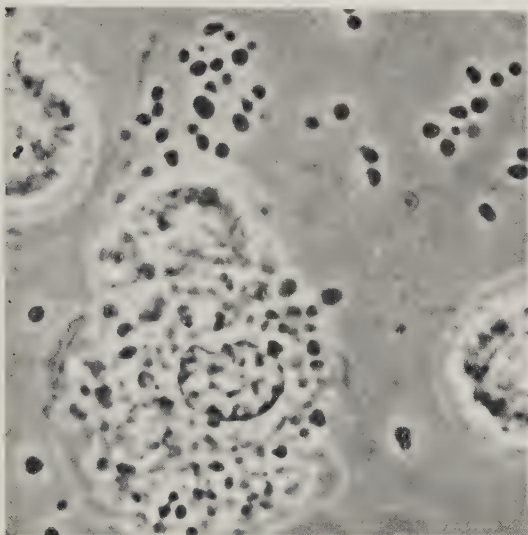


FIG. 28

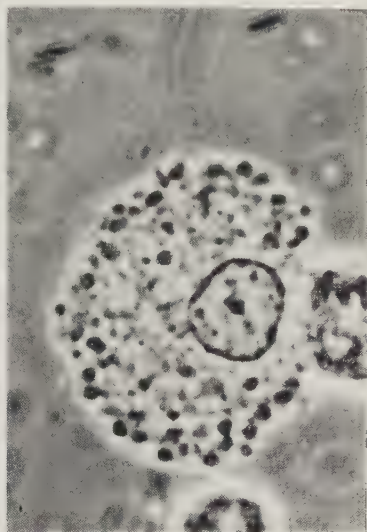


FIG. 27 et 28. Action du 48/80 sur des mastocytes péritonéaux examinés vivants et en contraste de phase (traitement par le 48/80 à la concentration de $5 \mu\text{g}$ par ml). Noter la libération, dans le milieu extra-cellulaire, de granules dont certains sont de taille augmentée. La cellule elle-même n'est plus bien limitée. Le noyau apparaît nettement; le moins grand nombre de granules dans le cytoplasme permet de mieux distinguer la structure nucléaire ainsi que quelques chondriosomes, notamment dans la figure 28, à droite (Agr. $\times 1\,750$).

Si on poursuit les observations à 37°C , en contraste de phase et à fort grossissement, on constate que les granules mastocytaires libérés dans le milieu liquide peuvent être phagocytés par des cellules péritonéales possédant des propriétés histiocytaires mais non par des leucocytes éosinophiles. Outre les mastocytes, toutes les cellules semblent souffrir : elles tendent à revenir sur elles-mêmes et à s'arrondir. Leur noyau de forme régulière, généralement ovoïde au début de l'expérience se déforme progressivement et finit par présenter de profondes incisures. Cependant, les phagocytes ne s'attaquent pas immédiatement aux mastocytes éclatés, tout au moins dans la première demi-heure qui suit le début du traitement par le 48/80. Dans les

limites de cette expérimentation qui n'a jamais excédé une heure, la forme du noyau des mastocytes reste relativement régulière, tandis que le réseau chromatinien et parfois l'un ou l'autre nucléole restent bien visibles; la membrane nucléaire, par contre, semble s'épaissir. Dans le cytoplasme périnucléaire, les vacuoles claires gonflent et les restes cytoplasmiques ont tendance à se désagréger.

Comme ces conditions expérimentales ne nous permettent pas de prolonger longtemps nos observations, nous avons eu recours à l'examen de cultures de cellules péritonéales traitées, dès leur mise en culture, par le 48/80 (à la concentration de 1 et 5 μg par ml) pour connaître le sort des mastocytes éclatés. Parmi ces cellules péritonéales, les mastocytes éclatés persistent pendant quelques heures dans la culture. Le noyau se condense progressivement en une petite masse (qui devient très chromophile au bleu de toluidine) pour finalement disparaître. Petit à petit, les débris mastocytaires se désagrègent pour être finalement phagocytés. Ce processus peut durer 24 et même 48 heures. Avec des concentrations de 48/80 égales ou supérieures à 5 μg par ml, aucun mastocyte ne survit; mais, à des doses voisines de 1 μg par ml, l'un ou l'autre mastocyte peut encore être identifié dans les cultures. Il semble que dans ce dernier cas, bien que des lésions soient visibles dans tous les mastocytes, certains qui n'ont éjecté qu'un petit nombre de granules sont capables de résister au traitement et de survivre.

B. — LE 1935 L

Ce libérateur d'amines a été utilisé à des concentrations de 50 μg par ml au cours d'un petit nombre d'exams.

Les modifications morphologiques observées au niveau des mastocytes sont analogues à celles que nous avons décrites pour le 48/80. Aucune différence significative n'a été décelée en ce qui concerne les effets respectifs de ces deux libérateurs d'amines. Immédiatement après l'addition de 1935 L à la préparation, des granules mastocytaires sont expulsés dans le milieu extra-cellulaire. Des altérations plus importantes se manifestent après quelques secondes au niveau des mastocytes et toutes les cellules de ce type sont atteintes.

C. LE POLYBRÈNE

Nous verrons plus loin (p. 109) que cette substance a la capacité, *in vitro*, de faire sortir l'histamine des mastocytes péritonéaux lorsque sa concentration dans le milieu est égale ou supérieure à 10 μg par ml. Nos observations en contraste de phase ont porté sur des mastocytes mis au contact de polybrène à des concentrations comprises entre 1 et 100 μg par ml. Les modifications morphologiques provoquées par ce libérateur sont d'autant plus rapidement visibles que sa concentration est plus élevée. Lorsque les mastocytes se trouvent dans un milieu contenant 100 μg de polybrène par ml et que l'expérience se déroule à 37 °C, le délai n'est que de quelques secondes. A la température du laboratoire, il faut 2 à 3 minutes pour déceler une lésion des mastocytes; la plupart de nos observations, ont été faites dans ces dernières conditions afin de suivre plus aisément le déroulement du phénomène.

Même à la concentration de 100 μg de polybrène par ml, les altérations mastocytaires ne se caractérisent pas par une expulsion des granules hors du cytoplasme. Au contraire, ceux-ci semblent se tasser dans la cellule tandis qu'une couronne de cytoplasme agranulaire apparaît à son pourtour; à partir de cette zone cytoplasmique périphérique, se développent très rapidement de nombreuses boursouflures (fig. 29). Nous avons interprété ces images comme l'indication d'une intoxication profonde de la cellule et vraisemblablement de sa mort. Pendant ce temps, les granules demeurent dans le cytoplasme, sans présenter aucun mouvement particulier; peu après, ils ont cependant tendance à s'agréger en petits groupes. Quant au noyau, on le discerne de moins en moins bien au fur et à mesure que la cellule s'altère, son aspect devient homogène; il se rétracte généralement et parfois est rejeté à la périphérie de la cellule. Si on poursuit l'observation, on constate que ces mastocytes altérés sont très rapidement entourés de macrophages et, dans les minutes qui suivent, on peut assister à leur phagocytose (fig. 30). A l'encontre également de ce qui se passe avec le 48/80 et le 1935 L, les autres cellules péritonéales, en particulier les cellules histiocytaires, semblent très peu affectées par la présence du polybrène. Elles restent étalées au contact du verre, ne s'arrondissent pas mais paraissent même se mouvoir plus activement que normalement,

FIG. 29

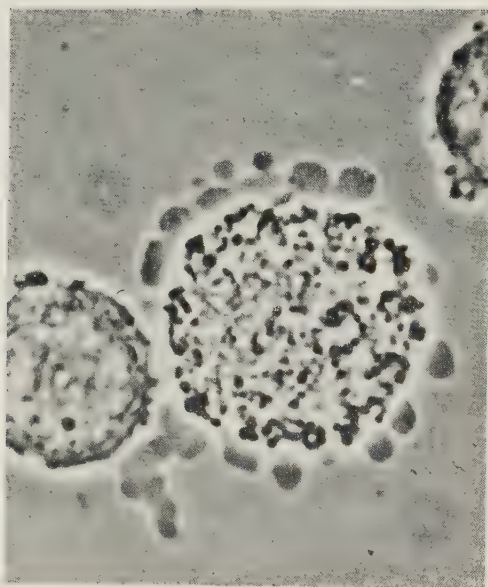


FIG. 30

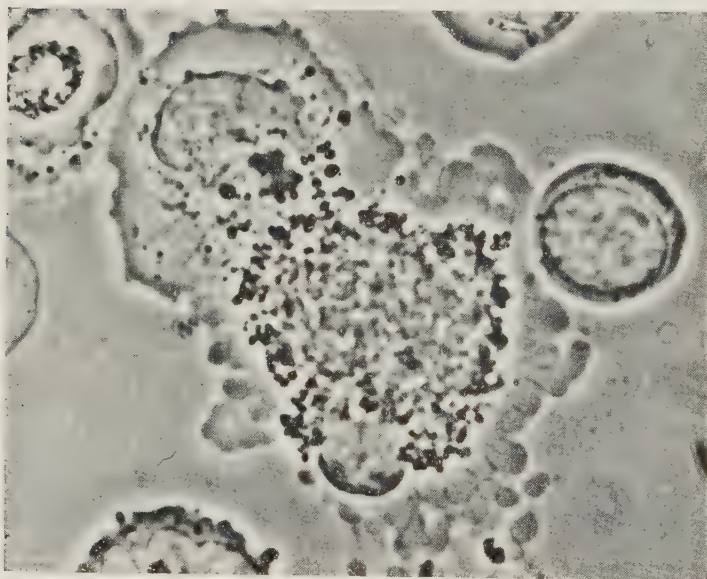


FIG. 29 et 30. *Altération des mastocytes sous l'action du polybrène à la concentration finale de 100 μ g par ml dans le milieu.*

FIG. 29 (en haut), mastocyte traité vivant par le polybrène 1 minute 30 secondes auparavant. Noter l'absence de granules mastocytaires extra-cellulaires et la présence de boursofflures cytoplasmiques tout autour de la cellule (Agr. $\times 1\ 750$).

FIG. 30 (en bas), dix minutes après le début du traitement par le polybrène, mastocyte en dégénérescence phagocyté par un macrophage. Noter l'apparence normale des autres cellules en présence de polybrène à forte concentration : à droite, un lymphocyte; en haut et à gauche, un leucocyte éosinophile (Agr. $\times 1\ 750$).

si bien qu'il est courant d'observer quatre ou cinq phagocytes s'attaquant au même mastocyte.

A des concentrations comprises entre 10 μ g et 100 μ g de polybrène par ml, les lésions sont essentiellement les mêmes; l'apparition des boursouffures périphériques est cependant plus lente à se produire; en d'autres termes, la survie des mastocytes est plus longue.

A des concentrations inférieures à 10 μ g de polybrène par ml, aucune atteinte mastocytaire n'est décelable. Comme nous le verrons plus loin, le passage d'histamine dans le milieu extracellulaire est alors pratiquement inexistant (voir p. 110).

Les lésions provoquées au niveau des mastocytes par le polybrène sont donc tout à fait différentes de celles observées avec le 48/80. Les mastocytes soumis à ce traitement meurent rapidement et sont immédiatement phagocytés sans que leurs granules cytoplasmiques soient expulsés de la cellule.

D. — LES DEXTRANS

On sait qu'après injection intraveineuse de dextran à l'animal, les manifestations cardio-vasculaires associées à la libération d'amines ne se produisent qu'après un certain délai, généralement après plusieurs minutes (LECOMTE, 1964). Aussi avons-nous surtout étudié l'effet du dextran sur des cellules ayant séjourné à son contact et à 37 °C pendant un certain laps de temps.

Immédiatement après le prélèvement, nous avons ajouté à la goutte de la suspension de cellules péritonéales déposée sur chacune des lamelles soit une goutte de solution de Hanks sans bicarbonate (contrôle), soit une goutte de cette même solution additionnée de dextran à la concentration de 12 g par litre. Deux sortes de dextran ont été utilisées, dont les poids moléculaires moyens se situaient aux environs de 75 000 et de 200 000.

Même après une heure à 37 °C, aucune altération cellulaire n'est perceptible au niveau des mastocytes (fig. 31 et 32). Ils sont généralement bien délimités et leur noyau ne présente aucun caractère particulier; leurs granules sont répartis régulièrement dans le cytoplasme et ont une taille normale. Comme dans le cas des mastocytes normaux non traités (voir p. 30), il est possible de distinguer au sein de la granulation du mastocyte,

FIG. 31

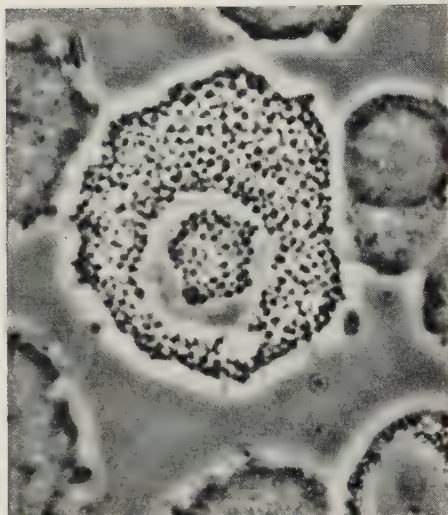


FIG. 32

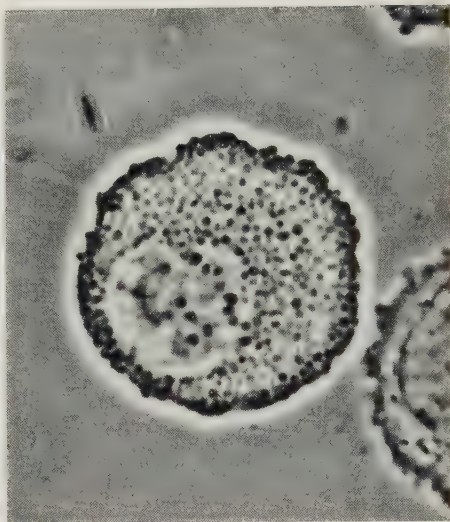


FIG. 31 et 32. *Mastocytes incubés 30 minutes dans un milieu additionné de 6 mg par ml de dextran. Poids moléculaire moyen du dextran utilisé : 75 000 pour la figure 30, 200 000 pour la figure 31. On n'observe aucune modification morphologique (Agr. $\times 1\,750$).*

de petites vésicules claires correspondant vraisemblablement chacune à l'emplacement d'un granule éjecté; cependant, ces vésicules ne sont pas plus nombreuses lorsque du dextran est dissous dans le milieu.

Notons cependant que les observations sont généralement plus malaisées quand la solution contient ce polymère. En effet, la viscosité du milieu étant plus élevée, il est plus difficile d'obtenir entre lame et lamelle une épaisseur de liquide optimale pour l'observation en contraste de phase sans léser les cellules.

Par ailleurs, le dextran est sans influence sur la morphologie des autres cellules péritonéales : histiocytes, leucocytes éosinophiles ou lymphocytes.

Bref, aucune modification cytologique en rapport avec la présence de dextran à la concentration finale de 6 mg par ml n'a pu être décelée.

E. — LES MILIEUX HYPOTONIQUES

Des expériences de deux types ont été réalisées :

- 1° Des cellules péritonéales (une goutte de la solution prélevée à l'animal) ont été déposées sur des lamelles qui ont été scel-

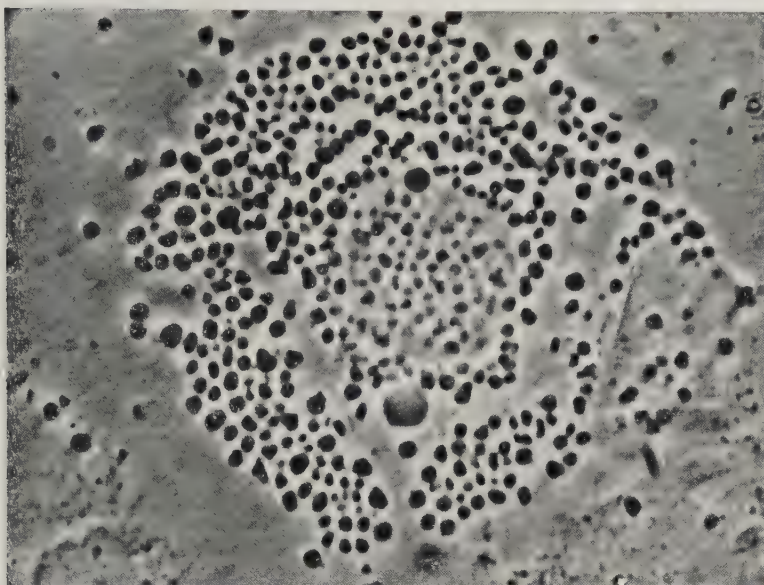
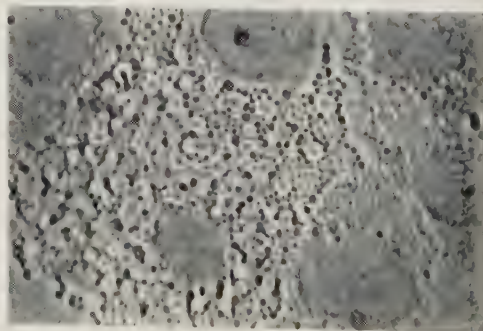
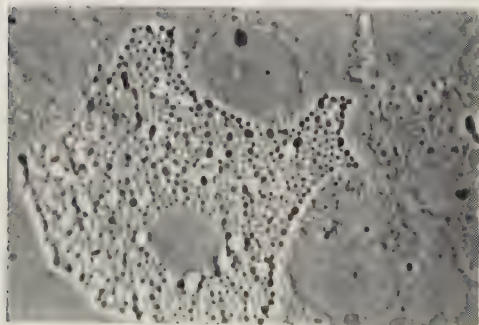
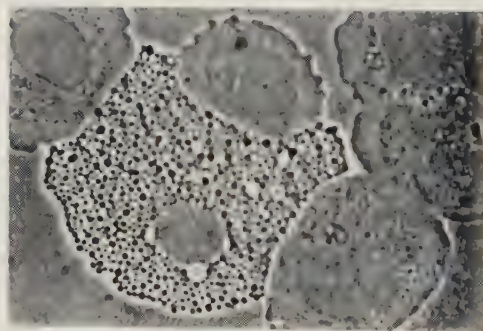
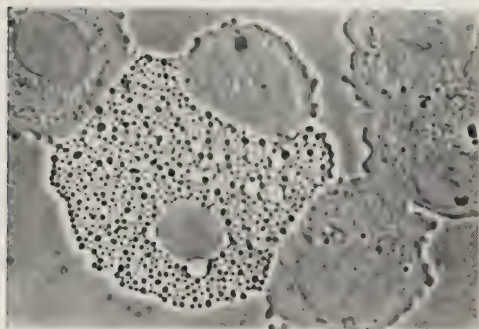
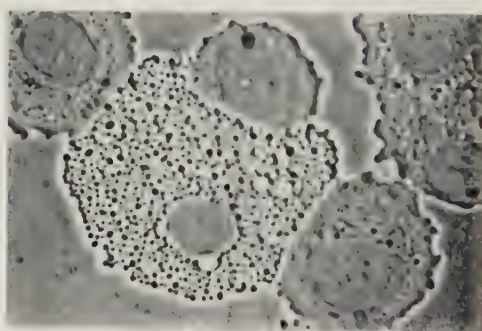
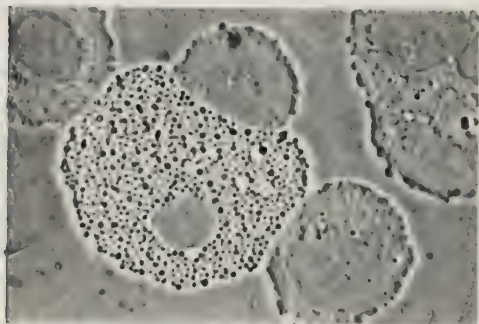
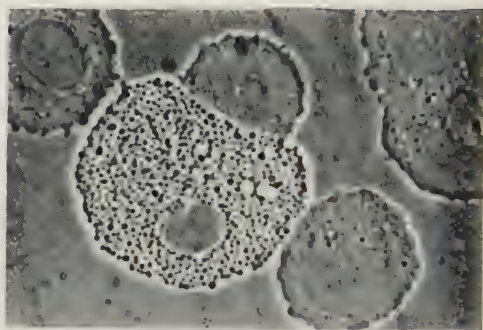
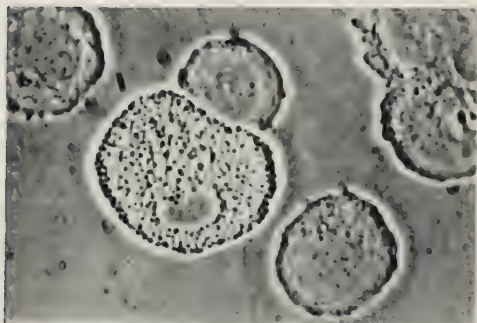


FIG. 33. Addition d'une goutte d'eau distillée à une goutte de suspension de cellules péritonéales. Après 5 minutes, les granules se sont répandus dans le milieu extracellulaire avoisinant. Certains granules augmentent fortement de taille (Agr. $\times 1\,750$).

lées avec de la paraffine sur des lames creuses; elles ont été maintenues à 37 °C un certain temps; nous avons ensuite ajouté à ces préparations une goutte d'eau distillée, juste avant de les examiner entre lame et lamelle;

- 2° Dans des préparations montées, entre lame et lamelle et sous le microscope, nous avons modifié la pression osmotique du milieu en déposant une goutte d'eau distillée d'un côté de la préparation et en l'aspirant de l'autre côté avec un morceau de papier filtre.

Lorsqu'on examine une préparation traitée selon la première modalité, on constate qu'il n'y a plus que des cadavres cellulaires; les mastocytes ne sont plus représentés que par des groupes de granules parmi lesquels on ne reconnaît généralement aucune trace de noyau. Par ailleurs, aucune limite cellulaire n'est plus visible. Quant aux granules, ils sont disposés en une seule couche et n'ont pas tendance à s'agglomérer; ils sont facilement déplacés par le moindre courant liquide qui prend naissance dans la préparation. Ce qui attire l'attention, c'est la variété de tailles



de ces granules. Certains sont à peine plus gros que les granules intracellulaires de mastocytes en bon état; d'autres, au contraire, surtout ceux qui apparaissent les plus sombres, ont un diamètre parfois cinq et même six fois plus grand (fig. 33).

En introduisant de l'eau distillée dans une préparation normale, on peut suivre les altérations des mastocytes dans un milieu devenant progressivement hypotonique (fig. 34 à 41). Ces derniers réagissent, comme les autres cellules; tout d'abord, ils s'arrondissent, ou tout au moins les irrégularités éventuelles de leur contour disparaissent; puis ils deviennent plus volumineux. Leur noyau reste central et arrondi mais augmente de volume, puis peu à peu devient homogène et enfin se désagrège. Dans ce cas, et contrairement à ce qui se passe avec le 48/80, il n'y a aucune projection de granules dans le milieu extracellulaire. La cellule entière semble s'étendre en surface au contact du verre, entraînant dans cet étalement les granules qui grossissent progressivement et laissent apparaître entre eux de petites vacuoles. A partir d'un certain moment, aucune structure périphérique ne semble plus retenir les granules qui sont facilement emportés par les courants liquides qui se produisent dans le milieu environnant.

Nous retiendrons surtout de ces observations que les mastocytes ne semblent pas se comporter de manière particulière vis-à-vis de cette agression brutale. Le déséquilibre osmotique les tue de la même façon que les autres cellules.

F. LE SÉRUM SANGUIN

Si des cellules péritonéales sont mises en présence de sérum frais en mélangeant sur lame ou sur lamelle une goutte de ce sérum avec une goutte de la suspension de cellules péritonéales telle que nous le retirons de la cavité abdominale et si ces préparations sont maintenues à 37 °C pendant un certain temps, on peut observer des altérations particulières au niveau des

FIG. 34 à 41. *Modifications morphologiques d'un mastocyte observé en contraste de phase après que le milieu ait été rendu hypotonique par l'addition d'eau distillée. Prises de vue à 30 secondes d'intervalle, montrant de gauche à droite et de haut en bas l'évolution de la même cellule. Le mastocyte s'étale progressivement. Aucun granule n'est expulsé individuellement dans le milieu extra-cellulaire, mais dans le cytoplasme se forment des vacuoles où on peut distinguer un granule augmentant en taille et de moins en moins sombre (Agr. $\times 1\,000$).*

mastocytes. Après environ 15 minutes d'incubation, on constate, en contraste de phase, que des granules commencent à être éjectés du cytoplasme. Comme dans le cas du 48/80, l'expulsion de chaque grain considérée individuellement est un processus extrêmement rapide qui se produit en une fraction de seconde, mais pour l'ensemble d'un mastocyte déterminé, le phénomène de dégranulation se poursuit généralement pendant 5 à 10 minutes, soit pendant un temps beaucoup plus long qu'avec les libérateurs d'amines du type 48/80.

Après l'action du sérum frais, une couronne de granules extra-cytoplasmiques entoure des mastocytes paraissant « mités »; en effet, à l'emplacement des grains expulsés du cytoplasme, sont apparues des lacunes claires qui tranchent avec les zones où persistent encore des granules. Finalement le cytoplasme des mastocytes a tendance à se désagréger et conflue avec la masse des granules extra-cytoplasmiques. Si bien qu'après action du sérum, les mastocytes se présentent comme une masse de granules mal délimitée, entourant un noyau qui a tendance à revenir sur lui-même et à se condenser. Quant aux autres cellules péritonéales, elles paraissent s'altérer également. Certaines se lysent, en particulier les leucocytes éosinophiles; d'autres s'arrondissent; elles ne s'étalent pas sur le verre et leur noyau, difficilement visible, est fortement incisé.

En fait, le sérum frais déclenche des processus qui rappellent dans une certaine mesure ceux provoqués par le 48/80 ou le 1935 L. Dans tous ces cas, on assiste à l'éjection de granules cytoplasmiques hors du cytoplasme. Il y a, cependant, des différences entre ces agents capables de dégranuler les mastocytes. Le phénomène se produit après un certain temps de latence et se déroule en plusieurs minutes dans le cas du sérum frais; au contraire, l'effet est presque immédiat et ne prend au maximum que quelques secondes avec des libérateurs d'amines comme le 48/80.

G. — LA RÉSERPINE⁽¹⁾

Utilisé à la concentration de 5, 10 et 20 μg par ml, cet alcaloïde ne modifie en rien la morphologie des mastocytes péritonéaux

⁽¹⁾ Nos dilutions ont été faites à partir d'une solution de réserpine dans le propylène glycol (2,5 mg par ml). Nous n'avons observé aucun précipité.

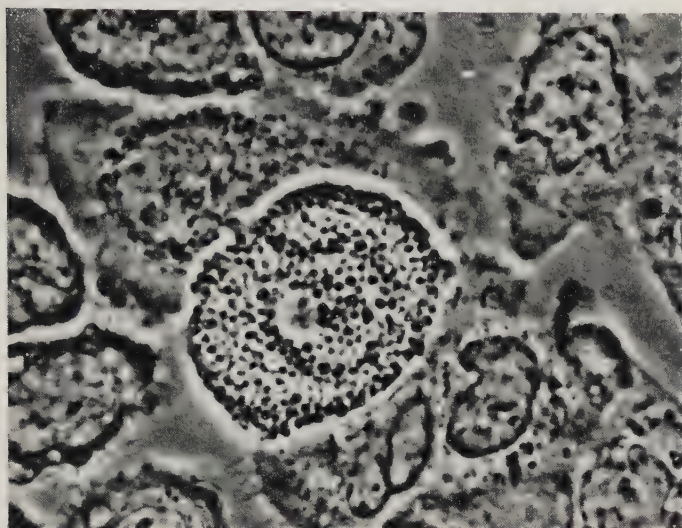


FIG. 42. Cellules péritonéales ayant séjourné une heure et demie à 37 °C en présence de réserpine à la concentration de 20 μ g par ml. Au centre de la figure, un mastocyte, qui ne présente aucune altération visible (Agr. $\times$ 1 750).

de rat, même si le séjour préalable à 37° C a duré une heure et demie (fig. 42). Les autres cellules péritonéales (cellules histiocytaires, leucocytes éosinophiles, lymphocytes) sont bien vivantes et s'étalent sur le verre.

* * *

Nous verrons plus loin qu'une libération d'amines mastocytaires a été mise en évidence chaque fois que ces cellules paraissaient lésées. L'ensemble de ces observations cytologiques nous permet d'affirmer que cette libération ne relève pas d'un processus qui se manifeste morphologiquement d'une façon identique dans chaque cas. Il n'y a rien de commun, par exemple, entre la destruction des mastocytes dans des milieux rendus hypotoniques et leur dégranulation par les libérateurs chimiques d'amines.

2. — ÉTUDE CYTOCHIMIQUE DES MASTOCYTES TRAITÉS

Nous avons aussi recherché si les différentes altérations des mastocytes que nous venons de décrire s'accompagnent de modifications cytochimiques. Les cellules péritonéales ont été traitées

par les agents amino-libérateurs dans des conditions similaires à celles que nous avons rapportées. Les préparations ont été généralement fixées dans un mélange alcool-formol.

A. — LES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

Si on soumet les mastocytes à l'action d'un libérateur du type du 48/80, les granules — qu'ils soient libérés dans le milieu extra-cellulaire ou qu'ils soient restés autour du noyau — sont colorables par le bleu de toluidine (métachromasie) (fig. 43), par le bleu alcian ou par la fuchsine-paralaldéhyde. L'intensité de ces colorations serait peut-être légèrement atténuée au niveau des plus gros granules. Si on admet que ces colorations mettent des mucopolysaccharides sulfatés en évidence, nous n'avons pu observer, dans aucun cas des images suggérant la libération de ces mucopolysaccharides, par exemple une coloration diffuse autour des mastocytes. Des résultats identiques ont été obtenus avec le sérum frais et les solutions hypotoniques.

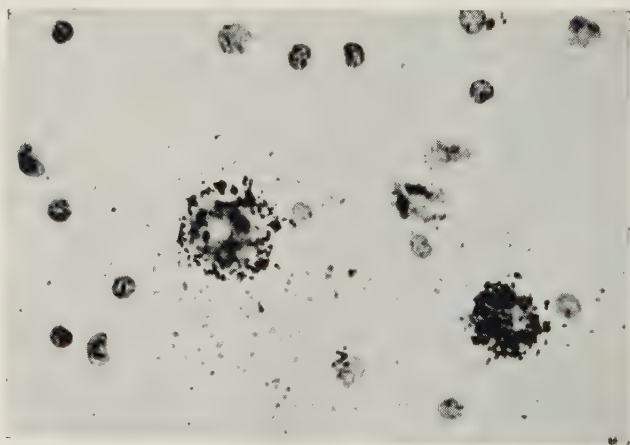


FIG. 43. Deux mastocytes péritonéaux traités par le 48/80 à la concentration de 10 μg par ml. Coloration au bleu de toluidine, après fixation à l'alcool-formol. Les granules mastocytaires conservent leurs propriétés métachromatiques, qu'ils soient intra-cellulaires ou extra-cellulaires (Agr. $\times 875$).

Les mastocytes traités par le polybrène se présentent cependant différemment du point de vue cytochimique. Si on fait agir cette substance à la concentration de 100 μg par ml, sur des mastocytes vivants, leurs granules ne sont plus colorables après

fixation à l'alcool-formol, ni par le bleu de toluidine, ni par la fuchsine-paraldéhyde. Au contraire, la coloration au bleu alcian à pH 0,2 en solution dans l'acide sulfurique dilué persiste (fig. 44). Cependant, si avant d'être colorées par le bleu de toluidine ou la fuchsine-paraldéhyde, les préparations traitées vivantes par le polybrène, puis fixées, sont plongées pendant quelques minutes dans une solution diluée d'acide sulfurique (pH 0,2) ou d'acide chlorhydrique normal, la colorabilité habituelle des granules est rétablie. Pour des concentrations de polybrène inférieures à 100 μg par ml, l'intensité de la coloration des mastocytes au bleu de toluidine et à la fuchsine-paraldéhyde est seulement diminuée. Elle est comparable à celle des mastocytes normaux pour des concentrations inférieures à 10 μg par ml. Remarquons que dans le cas des préparations traitées par le polybrène à forte concentration et colorées par le bleu de toluidine, la teinte orthochromatique (des noyaux, par exemple) persiste mais est affaiblie. Nous avons également étudié l'action du polybrène à la concentration de 100 μg par ml sur des préparations traitées non vivantes, mais après la fixation. Quand on les met en présence de ce libérateur d'histamine pendant plus

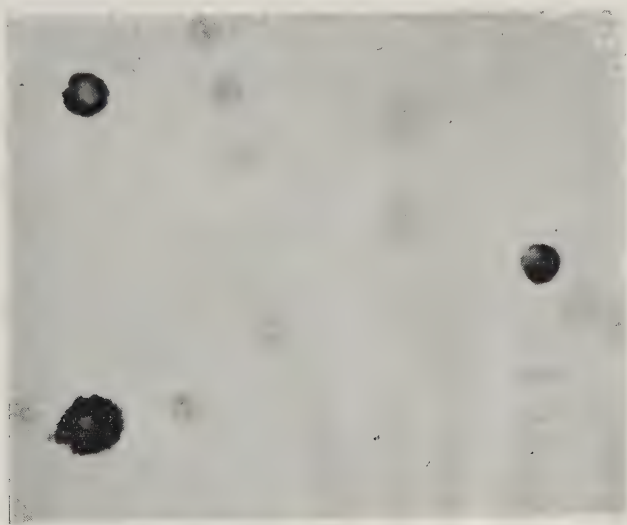


FIG. 44. Action du polybrène (100 μg par ml) sur les mastocytes péritonéaux. Coloration au bleu alcian à pH 0,2 après fixation à l'alcool-formol. La présence des mucopolysaccharides peut encore être démontrée par cette technique. Noter qu'aucun granule mastocytaire n'a été expulsé de la cellule (Agr. $\times$ 875).

de 5 minutes, les résultats sont analogues à ceux obtenus sur préparations vivantes : abolition de la coloration au bleu de toluidine et à la fuchsine-paraldéhyde, persistance de la coloration au bleu alcian (voir tableau I).

Notons, enfin, que les mastocytes se colorent normalement lorsqu'ils sont traités par le dextran ou la réserpine.

B. — COLORATION PAR LE RÉACTIF DE SCHIFF

Quel que soit le libérateur d'histamine utilisé, à l'exception du polybrène, tous les granules mastocytaires, même ceux qui sont libérés dans le milieu extra-cellulaire, restent positifs au réactif de Schiff. Dans le cas du polybrène, les granules restent incolores. On peut cependant les rendre colorables par un traitement à l'acide sulfurique dilué ou à l'acide chlorhydrique en solution normale comme c'est le cas pour le bleu de toluidine et la fuchsine-paraldéhyde de Gomori.

C. — LES LIPIDES

Nous avons recherché, plus particulièrement dans le cas de préparations traitées par le 48/80, s'il y avait un démasquage de lipides qui seraient alors histochimiquement décelables par le noir Soudan. Toutes nos recherches sont restées vaines, en particulier au niveau des granules.

D. — LES AMINES BIOGÈNES

Nous avons vu que, dans les préparations fixées aux vapeurs de paraformaldéhyde, les mastocytes péritonéaux présentent une fluorescence jaune-vert en lumière ultra-violette (voir p. 54). Rappelons que, d'après FALCK (1962), cette fluorescence serait due aux amines biogènes présentes dans les mastocytes et, notamment, à la 5-hydroxytryptamine. Des préparations traitées, à différentes concentrations, par le 48/80, le 1935 L, du dextran de poids moléculaire moyen de 75 000, le polybrène, l'eau distillée et la réserpine, ont été examinées en U V, après fixation adéquate. Ensuite, ces mêmes préparations ont été colorées par le bleu de toluidine afin de vérifier l'état des mastocytes.

TABLEAU I. Mise en évidence des mucopolysaccharides mastocytaires dans des préparations de cellules péritonéales traitées par le polybrène avant ou après fixation.

	Concentration du polybrène (en μg par ml)	Bleu de toluidine		Aldéhyde-fuchsine		Bleu alcian
		sans traitement préalable par H_2SO_4 dilué	après traitement préalable par H_2SO_4 dilué	sans traitement préalable par H_2SO_4 dilué	après traitement préalable par H_2SO_4 dilué	
Mastocytes non traités par le polybrène	néant	+	(métachr.)	—	—	+
	100	0	+	(métachr.)	+	+
Mastocytes traités par le polybrène	10	+	(métachr.)	+	+	+
	100	0	+	(métachr.)	+	+

Nos résultats sont résumés dans le tableau II. Après traitement par le dextran seul ou par la réserpine, la fluorescence mastocytaire persiste. Dans tous les autres cas, tout au moins lorsque la concentration en amino-libérateur est suffisante ou lorsque le milieu est suffisamment hypotonique, les mastocytes ne sont plus repérables en lumière ultra-violette; aucune fluorescence jaune-vert n'est décelable ni dans les cellules, ni dans le milieu extra-cellulaire. D'une manière générale, la fluorescence ne persiste que si les mastocytes sont encore intacts morphologiquement.

Avec les différents agents pharmacodynamiques que nous avons utilisés, une nette différence apparaît entre les effets produits sur les deux principaux groupes de substances renfermées dans les mastocytes, c'est-à-dire entre les mucopolysaccharides sulfatés et les amines biogènes. Les premiers, constituants essentiels des granules, ne semblent pas passer sous forme dissoute dans le milieu extra-cellulaire, à la faveur d'une lésion spécifique ou non du mastocyte; les secondes, au contraire, sont libérées très rapidement dès que la morphologie des cellules est altérée.

TABLEAU II. Fluorescence des mastocytes péritonéaux après l'action d'amines ou de la réserpine.

		Fluorescence	Lésions mastocytaires morphologiquement décelables
Polybrène	10 $\mu\text{g/ml}$	+	±
	50 $\mu\text{g/ml}$	0	+
	100 $\mu\text{g/ml}$	0	+
48/80	0,5 $\mu\text{g/ml}$	+	0
	5 $\mu\text{g/ml}$	0	+
	50 $\mu\text{g/ml}$	0	+
1935 L	0,5 $\mu\text{g/ml}$	+	0
	100 $\mu\text{g/ml}$	0	+
	200 $\mu\text{g/ml}$	0	+
Dextran	6 mg/ml	+	0
Eau distillée	50 %	0	+
Réserpine	5 $\mu\text{g/ml}$	+	0
	10 $\mu\text{g/ml}$	+	0
	20 $\mu\text{g/ml}$	+	0

3. — DOSAGES D'HISTAMINE DANS DES PRÉPARATIONS TRAITÉES PAR DES AMINO-LIBÉRATEURS ⁽¹⁾

La libération d'histamine à partir de mastocytes péritonéaux de rat a été bien étudiée *in vitro* dans les cas du 48/80 (UVNÄS et THON, 1960; YAMURA et WATANABE, 1961; BRAY et VAN ARDSEL, 1961), du 1935 L (BRAY et VAN ARDSEL, 1961) et de l'eau distillée (ARCHER, 1959; MORAN et coll., 1962). Par contre, en ce qui concerne le polybrène et le sérum, aucune donnée n'existe dans la littérature. De plus, il nous a paru nécessaire de vérifier si le dextran ne libère pas d'histamine dans nos conditions d'expériences, c'est-à-dire en l'absence de sérum ou de plasma. En effet, bien qu'ARCHER (1959), LAGUNOFF et BENDITT (1959a), CRONBERG et NILSSON (1964) soient d'accord pour affirmer qu'*in vitro*, le dextran est incapable de faire passer l'histamine des mastocytes péritonéaux dans le milieu extracellulaire, BERALDO et ses collaborateurs (1962) ont observé que dans la peau du rat, se produisait, même *in vitro*, une dégranulation avec libération de cette amine. Pour ces différentes raisons, nous avons décidé de compléter nos recherches sur les libérateurs d'histamine par des dosages biologiques de cette amine dans des préparations traitées soit par le polybrène, soit par le sérum frais, soit encore par le dextran.

A. — ACTION DU POLYBRÈNE

Nous avons utilisé deux groupes de 4 rats mâles, âgés de 2 mois environ et provenant de la même nichée. Après prélèvement suivant notre technique habituelle, les cellules péritonéales ont été réparties de manière égale entre 4 flacons de Carrel. Après dépôt des cellules sur le fond, le surnageant (S. I.) a été décanté et remplacé par 2 ml d'un milieu de culture de composition chimique bien définie, le NCTC 109 (Difco), additionné ou non de polybrène. Chaque rat du premier groupe

(¹) Tous les dosages biologiques rapportés dans ce mémoire ont été effectués en collaboration avec le Professeur J. LECOMTE (Institut Léon Frédéricq — Physiologie) que nous remercions vivement.

d'animaux-frères a fourni 3 flacons qui reçurent cette substance aux concentrations finales respectives de 1, 5 et 10 μg par ml; le quatrième flacon servit de contrôle et ne reçut pas de polybrène. Pour le second groupe d'animaux, nous avons fait agir le polybrène dans les mêmes conditions mais à des concentrations finales de 20, 50 et 100 μg par ml.

Après une incubation d'une demi-heure à 37 °C, le milieu liquide (S. II.) de tous les flacons a été retiré à la pipette. Pour les flacons correspondant aux animaux du premier groupe, nous avons procédé à une incubation supplémentaire à 37 °C dans un milieu de même composition, pendant une demi-heure. Après ce délai, le liquide contenu dans les flacons a été décanté (S. III.), les cellules adhérant toujours au fond des flacons. Liquides et flacons sont conservés ensuite à -20 °C jusqu'au moment des dosages d'histamine. Ainsi, nous avons pu estimer la quantité d'histamine libérée dans les milieux liquides (histamine extra-cellulaire) et celle d'histamine conservée par les mastocytes pendant l'incubation (histamine intracellulaire).

L'histamine qui était présente dans les mastocytes et qui a été libérée au moment de la congélation est aisément mise en solution dans du liquide de Tyrode. Un seul et même ml de ce liquide est utilisé pour « laver » successivement les 4 flacons qui avaient été traités par du polybrène à la même concentration. Pour chacune de ces concentrations, on obtient ainsi une estimation de la teneur en histamine intracellulaire par flacon. Quant aux surnageants correspondants, ils ont été également réunis et leur concentration en histamine déterminée. Les quantités d'histamine (rapportées en bichlorhydrate d'histamine) présente dans ces liquides ont été évaluées en mesurant l'action hypotensive de cette amine sur la pression artérielle du chat vagotomisé. L'utilisation de l'iléon de cobaye pour le dosage de l'histamine n'est pas possible dans ce cas, en raison de l'effet moteur propre que le polybrène exerce sur cet organe.

Par ailleurs, l'état des mastocytes a été contrôlé, dans tous les cas et à chaque stade de l'expérimentation, par examen au microscope inversé à moyen grossissement et en lumière ordinaire.

Résultats (voir tableau III). Préalablement à chaque expérience, nous avons vérifié au microscope si les mastocytes de nos préparations sont en bon état. De plus, nous nous sommes

TABLEAU III. Action du polybrène sur les mastocytes péritonéaux du rat

	1er groupe				2e groupe			
	Témoin		Polybrène (en µg/ml)		Témoin		Polybrène (en µg/ml)	
	—	1	5	10	—	20	50	100
Histamine extra-cellulaire (en µg)								
I. dans le liquide de lavage de la cavité péritonéale (S. I.)	0	0	0	0	0	0	0	0
II. dans le surnageant après 1/2 h à 37 °C (S. II.)	0	0	0	0	0	0,08	0,2	0,36
III. dans le surnageant après 1 h à 37 °C (S. III.)	—	0	0,02	0,05	—	—	—	—
Histamine intracellulaire (en µg)								
	0,8	0,36	0,35	0,37	1,54	0,4	0,35	0,15
Quantité totale d'histamine par flacon (en µg)	0,8	0,36	0,37	0,42	1,54	0,48	0,55	0,51
Présence de lésions mastocytaires morphologiquement décelables	0	0	0	0	0	±	+	++

assuré qu'il n'y a pas d'histamine ni d'autres principes hypotenseurs dans le liquide de lavage de la cavité pérotonéale (S. I.). Rappelons que lorsque les mastocytes sont mis en présence de polybrène à des concentrations inférieures à 20 μg par ml, ils ne semblent pas altérés. Pour de plus fortes doses, certains d'entre eux présentent une granulation anormale, leur contour paraît déchiqueté. Cependant, il ne semble pas y avoir à proprement parler d'expulsion de granules cytoplasmiques dans le milieu extra-cellulaire (voir nos observations en contraste de phase, p. 95). Si le liquide du flacon renferme 20 μg de polybrène par ml, le pourcentage des mastocytes qui apparaissent lésés lorsqu'on les observe à moyen grossissement et en lumière ordinaire après $\frac{1}{2}$ heure, est bas (environ 2 à 3 %). Pour une concentration de 50 à 100 μg par ml, il s'élève respectivement à 25 et 80 % environ.

La libération d'histamine ou d'autres produits hypotenseurs dans la phase liquide à partir des mastocytes, peut être mise en évidence après une demi-heure de contact, pour des concentrations en polybrène supérieures à 20 μg par ml; le surnageant exerce chez l'animal réactif une action hypotensive d'intensité croissant avec la dose de polybrène. Inversement, lorsque cette concentration passe de 20 μg à 100 μg par ml, l'histamine restée dans les mastocytes diminue : le rapport de l'histamine intra-cellulaire à l'histamine extra-cellulaire est presque inversé. Ces résultats sont en parfait accord avec les observations morphologiques citées plus haut. Si l'action du polybrène est prolongée pendant un laps de temps supplémentaire d'une demi-heure, de faibles quantités d'histamine sont cependant libérées à des concentrations moindres.

Par ailleurs, quelle que soit la teneur du milieu en polybrène, les quantités d'histamine totale par flacon (histamine intra-cellulaire + histamine extra-cellulaire) sont inférieures à celles des témoins. Pour expliquer cette anomalie, différentes solutions contenant, en quantités connues, de l'histamine, de l'héparine et du polybrène, seuls ou en mélange, ont été injectées à des rats pour déterminer leurs effets sur la pression artérielle. Dans ces conditions, l'activité hypotensive de l'histamine est réduite d'environ 20 %. Le délai pendant lequel l'histamine reste en présence de ces deux substances avant l'injection ne semble pas déterminant. Ces résultats suggèrent que le complexe polybrène-

héparine, qui se forme vraisemblablement au cours de nos expériences, est capable de réduire l'activité biologique de l'histamine. Il est possible que dans les flacons de Carrel, une partie de l'histamine puisse être retenue au niveau des mastocytes ou de leurs débris et soit inactivée par fixation sur le complexe polybrène-héparine.

Le polybrène est donc capable, à des concentrations supérieures à 20 μg par ml, de libérer, du moins en partie, l'histamine présente dans les mastocytes péritonéaux de rat maintenus en survie *in vitro*. Par ailleurs, la réduction de l'activité histaminique totale des préparations traitées par le polybrène pourrait être mise en relation avec une inactivation de l'histamine résultant de la fixation de cette amine sur le complexe polybrène-héparine formé au niveau des mastocytes ou de leurs débris.

B. — LE SÉRUM FRAIS

Le schéma d'expérimentation conçu pour le polybrène a été quelque peu modifié pour mettre en évidence, par dosages biologiques, les propriétés amino-libératrices du sérum frais. Il importait, dans ce cas, de connaître le résultat fourni par chacune des préparations; en effet, comme nous le verrons plus loin (p. 138), l'importance des lésions mastocytaires apparentes n'est pas constante pour un même pourcentage de sérum frais dans les différentes préparations même si celles-ci proviennent d'un même animal.

Les prélèvements effectués chez 6 animaux (âgés de 2 à 3 mois et pesant de 150 à 225 g) ont été répartis dans 18 flacons. Dix minutes après le transfert *in vitro* des cellules péritonéales, le liquide de prélèvement a été remplacé soit par de la solution NCTC 109 de « Difco » utilisée telle quelle, soit par la même solution additionnée d'une certaine quantité de sérum frais (dans tous les cas, nous avons introduit dans les flacons un volume de 2 ml). Les pourcentages de sérum frais mis en présence des cellules péritonéales sont compris entre 5 et 50 %. Après 35 minutes à 37 °C, les préparations sont examinées au microscope inversé à moyen grossissement. Le liquide surnageant des préparations est ensuite enlevé à la pipette. Les flacons Carrel au fond desquels les cellules péritonéales adhèrent encore, ainsi que le surnageant ont été conservés à —20 °C jusqu'au

moment d'effectuer les dosages biologiques. Ces derniers ont été réalisés en utilisant l'iléon de cobaye selon la technique classique (voir notamment FELDBERG et note au bas de la page 109). Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV.

Pour une concentration en sérum frais dans le milieu, inférieure à 10 %, nous n'avons relevé aucune libération d'histamine ni de substances ayant des effets moteurs sur l'iléon de cobaye. En particulier, dans aucune des préparations-contrôle, c'est-à-dire sans sérum (une pour chacun des 6 animaux), nous n'avons pu mettre en évidence de l'histamine dans le milieu liquide. Par contre, pour des concentrations en sérum frais égales ou supérieures à 10 %, les mastocytes perdent de leur histamine tandis que de l'histamine apparaît dans le liquide des mastocytes péritonéaux. Dans l'ensemble, on peut dire que

TABLEAU IV. Libération d'histamine par le sérum frais à partir de mastocytes péritonéaux maintenus en survie *in vitro* pendant 35 minutes.

Désignation de la préparation ^a	Pourcentage du sérum dans le milieu	Histamine intracellulaire en μg (Hi)	Histamine extra-cellulaire en μg (He)	Histamine totale par préparation en μg	Rapport Hi/He	Pourcentage des mastocytes altérés
Ia	—	5,25	0	5,25	0	0
IIa	—	3	0	3	0	0
IIIa	—	5	0	5	0	0
IVa	—	3,6	0	3,6	0	0
Va	—	4,5	0	4,5	0	0
VIa	—	2,4	0	2,4	0	0
IIIc	5	3,4	0	3,4	0	0
IVb	5	3,8	0	3,8	0	0
Ib	10	4	<0,7	4,3	faible	0
Vb	10	2,5	<0,7	2,8	faible	0
VIc	10	2,2	0,7	2,9	0,31	0
IIb	20	5,4	1,4	6,8	0,25	0
IVc	20	4,2	0,7	4,9	0,16	36 %
VIb	20	5,6	0,7	6,3	0,12	0
IIIb	30	3,4	1,4	4,8	0,41	45 %
Ic	50	0	2,8	2,8	$\rightarrow\infty$	>99 %
IIc	50	0,15	2,8	2,95	18,6	95,7 %
Vc	50	1,5	1,4	2,9	0,99	76,6 %

^a Les chiffres romains désignent l'animal dont provient le prélèvement.

la libération d'histamine est d'autant plus considérable que la concentration du milieu en sérum frais est plus élevée.

Il n'y a cependant pas concordance parfaite entre la libération d'histamine (évaluée par le rapport de la quantité d'histamine intracellulaire à celle de l'histamine présente dans le milieu liquide) et l'importance des altérations morphologiques (estimées par le pourcentage de mastocytes lésés par rapport au nombre total de ces cellules observées dans un certain nombre de champs microscopiques de la préparation). L'analyse du tableau IV le démontre.

Si une faible libération d'histamine se manifeste pour une concentration en sérum frais de 10 % dans les trois flacons ainsi traités, l'examen microscopique à moyen grossissement ne permet de déceler aucune lésion mastocytaire. Par ailleurs, s'il existe une certaine irrégularité d'action du sérum frais du point de vue morphologique (voir notamment le groupe de trois préparations traitées par du sérum frais à la concentration de 20 % dans lequel une seule, la préparation IVc, a présenté une atteinte cytologique nette des mastocytes), la quantité d'histamine présente dans le milieu liquide semble augmenter parallèlement à l'élévation du taux de sérum frais. Ces expériences démontrent qu'il existe dans ce sérum frais un facteur ou un groupe de facteurs capables de libérer l'histamine mastocytaire. Dans les conditions que nous nous sommes imposées et avec ce sérum, il faut que la concentration de ce dernier dans le milieu soit au moins égale à 10 % pour qu'une libération d'histamine soit décelable.

Le milieu NCTC 109 additionné du même sérum ne contracte pas l'iléon de cobaye.

C. — LE DEXTRAN

Notre plan d'expérience se rapproche ici de celui que nous avons adopté pour mettre en évidence l'action histaminolibératrice du polybrène (voir p. 109); nous n'avons cependant utilisé qu'un seul groupe d'animaux. Nous avons recherché les effets de trois concentrations différentes en dextran d'un poids moléculaire moyen de 75 000 (0,2, 1 et 6 g de dextran par litre). Cette substance a été dissoute dans du liquide de Hanks dépourvu de bicarbonate. Dans chaque condition expérimentale, une par-

tie de ce liquide additionné d'une certaine quantité de dextran a été mélangée à deux parties de liquide NCTC 109 (Difco). Nous avons aussi réalisé une expérience de contrôle sans dextran.

Les cellules prélevées ont été incubées dans ces différents milieux à 37 °C pendant 45 minutes. Après ce délai, nous avons procédé à un examen microscopique à moyen grossissement; aucune altération mastocytaire n'a été observée dans aucun des flacons. Quant aux dosages biologiques d'histamine (cf. note bas de la page 109), ils ont été réalisés en utilisant aussi l'iléon de cobaye.

TABLEAU V. Teneur en histamine des mastocytes maintenus pendant 45 minutes dans un milieu additionné de dextran d'un poids moléculaire moyen de 75 000.

	Histamine intracellulaire en μg	Histamine extra-cellulaire en μg	
		Liquide de prélèvement	Liquide d'incubation
Contrôle	2,3	0	traces
Dextran			
6 g/l	2,5	0	0
1 g/l	2,4	0	0
0,2 g/l	2,3	0	0

Comme le montre le tableau V, aucune libération d'histamine, sous l'influence du dextran, n'a pu être décelée. Il est possible au contraire que, dans une certaine mesure, celui-ci protège les mastocytes; en effet, des traces d'histamine sont présentes dans le milieu liquide des préparations sans dextran et semblent indiquer qu'après trois-quarts d'heure d'incubation, il existe une certaine souffrance mastocytaire. Signalons que nous nous sommes assuré que le dextran, utilisé à des concentrations et dans des conditions similaires à celles employées pour confectionner notre milieu d'incubation, ne provoquait ni ne supprimait l'action de l'histamine sur l'iléon de cobaye.

Nous confirmons donc les travaux de LAGUNOFF et BENDITT (1959a) qui avaient montré que, *in vitro*, le dextran ne produit par lui-même aucune lésion des mastocytes péritonéaux et ne libère pas d'histamine à partir de ces cellules.

DISCUSSION
DU CHAPITRE II

Comme nous l'avons rappelé au début de ce chapitre, un grand nombre de libérateurs d'amines ont été signalés. Parmi eux, nous avons nécessairement dû faire un choix et limiter ainsi nos investigations. Ce choix s'est justifié; il est en effet possible de dégager de nos expériences des conclusions importantes tant du point de vue morphologique et cytochimique que du point de vue de la libération d'histamine étudiée par dosages biologiques. Par ailleurs, il serait fastidieux de procéder à une analyse séparée de nos observations pour chacun des agents aminolibérateurs que nous avons utilisés. Aussi, envisagerons-nous directement dans leur ensemble nos différents résultats.

D'un point de vue morphologique, nos recherches montrent que les effets des amino-libérateurs sur des préparations de cellules péritonéales se manifestent de façon très variée.

Selon la nature de l'agent en cause, des lésions cellulaires sont visibles, soit uniquement au niveau des mastocytes, soit à la fois au niveau des mastocytes et d'autres cellules péritonéales. C'est ainsi que le polybrène ne semble s'attaquer qu'aux mastocytes, laissant intactes les autres cellules. Par contre, il en va autrement avec le 48/80 qui semble léser *toutes* les cellules.

Les altérations mastocytaires elles-mêmes sont très polymorphes, qu'elles soient provoquées par l'un ou par l'autre des amino-libérateurs. Par exemple, les lésions causées aux mastocytes par le 48/80 ne ressemblent en rien à celles dues au polybrène. Avec la première de ces substances, nous observons une projection des granules mastocytaires dans le milieu extracellulaire; avec la seconde au contraire, ces granules restent intracellulaires, tout au moins si la cellule ne se désagrège pas. L'existence de ces différences morphologiques entre mastocytes traités soit par le 48/80 soit par le polybrène, ne constitue cependant pas une preuve en soi que le mécanisme de la libération d'amines n'est pas le même dans les deux cas; cette libération pourrait n'être qu'un épiphénomène commun à différents processus lésionnels.

D'une manière générale, on peut d'ailleurs dire que, chaque fois que des lésions graves, quelles qu'elles soient, se manifestent au niveau des mastocytes, les amines quittent ces cellules. Il

n'y a donc pas d'images caractéristiques de la libération d'amines; en d'autres termes, aucun des différents aspects d'altérations mastocytaires que l'on peut observer avec les divers amino-libérateurs ne peut être considéré comme spécifique du phénomène.

Quant à nos *recherches cytochimiques*, elles apportent des précisions notamment en ce qui concerne deux constituants des granules mastocytaires : les amines biogènes et les mucopolysaccharides acides. Comme nous l'avons vu, on peut démontrer la présence des premières par leur fluorescence en U V après fixation des préparations aux vapeurs de paraformaldéhyde; la nature du constituant mis en évidence a soulevé des discussions (voir p. 78), mais actuellement, on pense qu'il s'agit de la 5-hydroxytryptamine (FALCK, 1962). BHATTACHARYA et LEWIS (1956) ainsi que PARRATT et WEST (1956) ont montré que le 48/80 libérait l'histamine des mastocytes tissulaires du rat aussi bien que leur 5-hydroxytryptamine. Nos recherches confirment et visualisent donc les faits rapportés par ces auteurs. Elles suggèrent que les amino-libérateurs, lorsqu'ils sont utilisés à doses efficaces, déclenchent une vidange concomitante des mastocytes en histamine et en 5-hydroxytryptamine; en effet, lorsque la concentration de ces agents est suffisante pour libérer une partie importante de l'histamine, elle est également capable de supprimer la fluorescence des mastocytes en U V.

Dans la grande majorité des cas, les substances qui, chez le rat, libèrent l'histamine, font simultanément passer en dehors de la cellule la 5-hydroxytryptamine. C'est pourquoi nous considérons ces substances non pas comme des « histamino-libérateurs » sélectifs, mais comme des « amino-libérateurs ». Selon la conception de J. LECOMTE (1966), leur pouvoir spécifique se définit, dès lors, non plus par un caractère pharmacodynamique mais bien par une attaque limitée à une structure cytologique particulière.

Au cours de ces recherches, l'action de la réserpine a retenu tout particulièrement notre attention. Cet alcaloïde peut, en effet, réduire très fortement la teneur en 5-hydroxytryptamine de certains tissus, notamment du système nerveux central (SHORE et coll., 1955, 1957; PAASONEN et VOGT, 1956; BRODIE et SHORE, 1957). Cependant, PADAWER (1966) n'a pas observé de diminution de la fluorescence des mastocytes péritonéaux

après administration de réserpine aux animaux chez lesquels ces cellules ont été prélevées. Pour notre part, nous n'avons pu observer, par la microscopie en fluorescence, aucun effet de la réserpine lorsque celle-ci est mise immédiatement au contact des mastocytes *in vitro*.

Cette substance ne semble pas provoquer de lésions morphologiquement décelables au niveau des mastocytes. Chez l'animal vivant, à doses suffisantes pour libérer la plus grande partie de la 5-hydroxytryptamine présente dans le système nerveux central, la réserpine ne lèse pas les mastocytes du rat (BHATTACHARYA et LEWIS, 1956; PADAWER, 1957; BENDITT, 1958) ou n'y cause que des altérations minimes (PARRATT et WEST, 1957b; BHATT, JALOTA et SANYAL, 1964). Rappelons que, *in vitro*, nous n'avons observé aucune action de la réserpine sur les mastocytes péritonéaux de rat, même à la concentration de 20 μg par ml. En effectuant des dosages biochimiques, MORAN, UVNÄS et WESTERHOLM (1962) ainsi que MORAN et WESTERHOLM (1963) ont d'ailleurs montré que la réserpine est incapable de libérer d'emblée la 5-hydroxytryptamine de ces mêmes cellules.

Ces résultats indiquent, dans l'ensemble, que la 5-hydroxytryptamine ne quitte pas immédiatement les mastocytes sous l'influence de la réserpine. L'histamine mastocytaire n'est pas non plus libérée par cet alcaloïde (MORAN et WESTERHOLM, 1963). Ces faits confirment qu'il existe donc un parallélisme entre les teneurs en histamine et en 5-hydroxytryptamine des mastocytes traités par différents agents pharmacodynamiques (voir plus haut).

Dosages d'histamine. Chaque fois qu'on l'a recherchée, on a pu établir une relation entre le nombre de mastocytes altérés et la quantité d'histamine libérée sous l'influence d'aminolibérateurs déterminés, employés à différentes concentrations. Pour le polybrène aussi bien que pour le sérum frais, nous avons montré que la libération d'histamine est d'autant plus considérable que la proportion de mastocytes lésés est grande dans la préparation envisagée. En ce qui concerne le 48/80, BLOOM et HAEGERMARK (1965) ont observé une semblable corrélation en utilisant le même matériel que nous. UVNÄS (1963) est d'ailleurs d'avis que le nombre de mastocytes dégranulés que l'on peut observer dans le mésentère de rat après exposition aux amino-libérateurs, est en rapport étroit avec la concentra-

tion de ces derniers; au même titre que l'évaluation de la quantité d'histamine libérée, l'établissement du pourcentage de mastocytes altérés peut, d'après cet auteur, servir de base à des recherches semi-quantitatives sur les effets des amino-libérateurs.

Il arrive pourtant que, lorsque la quantité d'histamine libérée est faible, on ne puisse mettre en évidence de lésions morphologiques — tout au moins décelables par la microscopie en lumière ordinaire ou en contraste de phase. C'est notamment le cas pour certaines préparations de cellules péritonéales qui ont été mises en présence de 10 % de sérum frais (voir tableau IV). BLOOM et HAEGERMARCK (1965) signalent aussi que, lorsqu'on traite les mastocytes péritonéaux par le 48/80, à la concentration de 0,1 μg par ml, les images de dégranulation sont exceptionnelles; or, à cette dose, le 48/80 libère 19 % de l'histamine mastocytaire. SMITH (1958) a d'ailleurs observé qu'*in vivo*, des substances comme le bleu de toluidine ou la protamine peuvent, si elles sont utilisées à petites doses répétées, libérer la plus grande partie de l'histamine des mastocytes sans que ceux-ci paraissent altérés. Lorsqu'on traite les mastocytes par ces amino-libérateurs et dans ces conditions, ils gonflent légèrement et perdent un peu de leur réfringence pendant un temps relativement court, mais ne se détruisent pas (SMITH, LEWIS et SVIHLA, 1960).

A la suite de leurs recherches au microscope électronique, BLOOM et HAEGERMARCK (1965) ont cependant attiré l'attention sur le fait que, si des doses faibles de 48/80 causent rarement des lésions visibles en microscopie ordinaire, le nombre de granules cytoplasmiques « altérés » dans leur ultra-structure est fortement augmenté (voir p. 71).

Contrairement à l'histamine et à la 5-hydroxytryptamine, l'héparine apparaît chez le rat comme un constituant peu labile, ne se solubilisant pas de manière avérée lorsqu'on fait agir les divers amino-libérateurs (RILEY, 1954; BRAUNSTEINER et coll., 1957; ARCHER, 1961). Sous l'effet de ces derniers, aucune substance anticoagulante n'apparaît dans le sang comme c'est le cas chez le chien (MOTA, 1954; WEST, 1962). Après traitement de mastocytes péritonéaux de rat par le 48/80, PAREKH et GLICK (1962) n'ont pas pu mettre en évidence de solubilisation de ce mucopolysaccharide, en recourant à des dosages d'hexosamine. Ces faits concordent parfaitement avec nos résultats.

Les colorations signalétiques des mucopolysaccharides acides persistent au niveau des granules aussi bien intracellulaires qu'extra-cellulaires après action des libérateurs d'histamine. Une déficience de colorabilité n'a été enregistrée que dans un cas, avec le polybrène lors de la coloration par le bleu de toluidine ou par la fuchsine-paraldéhyde. Les mucopolysaccharides sont cependant toujours présents et notre expérimentation démontre qu'il ne s'agit vraisemblablement que d'un blocage, par le polybrène, des fonctions chimiques réactives vis-à-vis du colorant. On sait en effet que le polybrène neutralise l'héparine aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (WEISS et coll., 1949).

* * *

Il convient maintenant de rechercher la signification de nos résultats en relation avec le ou les mécanismes d'action des amino-libérateurs.

Dans quelles conditions agissent ces amino-libérateurs ? Parmi ces substances, celle dont les conditions d'activité ont été le plus étudiées est sans conteste le 48/80. Il a été notamment établi que les phénomènes de dégranulation des mastocytes et de libération d'histamine qu'il provoque, requiert une fourniture d'énergie qui normalement dépend d'un métabolisme oxydatif (HÖGBERG et UVNÄS, 1957, 1960; UVNÄS, 1961). L'action du 48/80 est en effet inhibée par le froid, par l'anoxie et par différentes substances telles que le dinitrophénol, la thyroxine, le cyanure de potassium, etc... Les processus eux-mêmes ne semblent cependant pas être essentiellement aérobiques; en cas d'anoxie, le libérateur d'histamine peut être efficace à la condition que les mastocytes aient été maintenus, un certain temps auparavant, dans un milieu glucosé normalement oxygéné; la glycolyse peut alors fournir suffisamment d'énergie au déroulement normal de la dégranulation (UVNÄS, 1960; DIAMONT et UVNÄS, 1961). Ces résultats seraient valables non seulement pour la dégranulation provoquée par le 48/80 mais encore pour celle due à des extraits de *Cyanea* ou d'*Ascaris* ainsi que celle liée à des réactions antigène-anticorps (UVNÄS, 1963).

Plusieurs auteurs se sont demandé si, à partir de données recueillies sur les conditions d'activité de certains amino-libérateurs, on ne pourrait pas aborder le mécanisme d'action

de ces substances. Pour Uvnäs et son école, les résultats obtenus suggèrent que l'action du 48/80 consiste en l'activation d'un enzyme localisé dans la membrane plasmique du mastocyte, par exemple la phospholipase A. Toutefois, VAN ARDSEL et BRAY (1961), après avoir étudié les effets de différents inhibiteurs de la dégranulation, estiment que leurs propres résultats ne prouvent pas que le 48/80 déclenche une activation enzymatique. L'action des enzymes eux-mêmes sur les mastocytes est d'ailleurs très discutée. Il semble entre autres que la phospholipase A soit sans effet lorsqu'elle est très purifiée, tout au moins lorsqu'elle est utilisée en l'absence de sérum (KELLER, 1964a). Elle serait active par contre à dose extrêmement faible (1 $\mu\text{g/ml}$) en présence de sérum (SAEKI, 1964; DANON et coll., 1961; KACHLER, 1958). A une dose 50 fois supérieure (en poids) à la phospholipase A, l' α -chymotrypsine provoquerait la dégranulation des mastocytes *in vitro* en l'absence comme en présence de sérum (KELLER, 1966). Cependant, la variété des substances biologiques dégranulantes est tellement grande [enzymes, produits du catabolisme des phospholipides (KELLER, 1965a et b), extrait de tissus (ARCHER, 1958, 1959), ADP et ATP (KELLER, 1964b; etc.)...] qu'il est malaisé actuellement de se faire ainsi une idée claire des processus biochimiques qui conduisent à la dégranulation.

Comme KELLER (1966), nous pensons cependant qu'il est difficilement concevable qu'il existe un mécanisme d'action unique, commun à toutes les substances capables de léser les mastocytes et de libérer leurs amines. Certes, les hypothèses faisant intervenir l'activation d'enzymes déjà présents sous une forme inactive dans les mastocytes sont séduisantes, mais aucune démonstration satisfaisante d'un tel mécanisme n'a été apportée jusqu'à présent, ni pour la phospholipase A (KELLER et SCHWARZ, 1963), ni pour l' α -chymotrypsine (KELLER et SCHWARZ, 1963), ni pour la phospholipase C (KELLER, 1962).

Une autre hypothèse, suggérée par nos résultats s'énonce ainsi : les amines biogènes ne peuvent être maintenues *in situ*, dans les mastocytes que si les métabolismes généraux et particuliers de ces cellules sont assurés. S'ils sont perturbés ou inhibés, les amines ne sont plus retenues par les structures mastocytaires sur lesquelles elles sont fixées et elles passent dans le milieu extra-cellulaire. A plus forte raison, quand l'intoxication

par l'amino-libérateur entraîne rapidement la mort cellulaire, comme c'est le cas avec le polybrène, doit-on s'attendre à une libération d'amines. La diminution de l'activité du 48/80 en fonction de l'abaissement de la température ou de la chute de la pression partielle d'oxygène du milieu peut très bien s'expliquer par un ralentissement des processus métaboliques globaux, d'où un effet moins prononcé de cet amino-libérateur.

Notre hypothèse a aussi l'avantage d'expliquer la très grande variété des agents amino-libérateurs. Par ailleurs, il va de soi qu'une cellule très différenciée comme le mastocyte doit posséder des activités métaboliques qui sont propres à la fonction qu'elle remplit normalement dans l'organisme et qui sont peut-être en relation avec certaines substances qu'elle renferme, notamment les mucopolysaccharides sulfatés. Dès lors, il est logique de concevoir que certaines substances peuvent exercer une action élective sur les mastocytes; les lésions cellulaires qu'elles entraînent peuvent être alors caractéristiques de l'agent utilisé (48/80, polybrène). La libération des amines se produirait cependant de la même façon qu'après une lésion non spécifique de la cellule mastocytaire (eau distillée).

Bref, à la place de la conception selon laquelle la libération d'histamine serait le résultat de l'activation d'un processus métabolique, nous proposons l'hypothèse suivante : les amino-libérateurs lésaient plus ou moins gravement les mastocytes; diverses lésions ainsi provoquées entraîneraient l'arrêt du travail que ces cellules doivent normalement et continuellement effectuer pour retenir les amines dans les granules; ces amines seraient alors libérées.

Dans l'état actuel de nos connaissances, une objection peut être formulée à cette façon d'envisager la libération des amines mastocytaires. Si on procède à l'ultracentrifugation de mastocytes préalablement soumis à l'action des ultra-sons, on peut retrouver la plus grosse partie de l'histamine dans la fraction contenant les granules (LAGUNOFF et coll., 1964). HAGEN et ses collaborateurs (1959) ont également fait des observations similaires sur des mastocytes tumoraux. Nous ferons seulement remarquer que les conditions dans lesquelles les granules mastocytaires retiennent dans ces cas l'histamine, sont très particulières : ces granules sont suspendus dans une solution de sucrose et sont constamment maintenus à 4 °C. LAGUNOFF et

ses collaborateurs ont cependant montré que, si le séjour des granules se prolonge dans ces conditions, on note un appauvrissement progressif de ces derniers en histamine. De plus, en solution saline à la température du laboratoire, les granules ne conservent pas leur histamine. On peut penser que l'intensité du métabolisme cellulaire nécessaire pour retenir les amines dans les granules serait d'autant plus considérable que la température se rapproche de 37 °C. A 4 °C, ce métabolisme pourrait être pratiquement annulé sans que les amines quittent leur site normal de fixation.

L'histamine serait fixée à l'héparine des granules mastocytaires par une liaison du type électrostatique (SANYAL et WEST, 1956; WERLE et AMANN, 1956; KOBAYASHI, 1962; LAGUNOFF et coll., 1964). On peut se demander dès lors si le travail qui serait requis des mastocytes pour conserver leurs amines, ne consisterait pas en la préservation de la charge électrostatique de l'héparine constitutive des granules.

* * *

Quant à l'action amino-libératrice du sérum frais, personne avant nous ne l'avait signalée chez le rat ⁽¹⁾. Rappelons brièvement les principaux faits que nous avons mis en évidence à ce sujet. L'activité du sérum varie d'un lot à l'autre et, avec le même sérum, diffère d'une préparation de cellules péritonéales à l'autre; de toute façon, elle n'est appréciable que si la concentration du milieu en sérum frais atteint au moins 10 %. Par ailleurs, le sérum, même à forte concentration, ne produit aucune altération si, préalablement à la mise au contact des mastocytes, il est maintenu au moins 48 heures à 37 °C (voir p. 135) ou si la concentration en ions sulfate du milieu de survie de ces cellules est augmentée (voir p. 138). Ce phénomène n'est pas de nature immunologique.

Certains facteurs sériques interviennent dans différents cas de libération de l'histamine mastocytaire; quelques substances ne sont actives qu'en présence de sérum, comme nous venons

(1) FELDBERG et SCHACHTER (1952) ont également obtenu une libération de l'histamine présente dans la peau de chat non sensibilisée, en perfusant celle-ci avec du sérum de cheval; après ébullition, ce sérum n'est plus capable de libérer l'histamine.

de le voir en étudiant les propriétés du dextran. De plus, chez le rat, KELLER (1966) a traité par des globulines de lapin anti-rat, des mastocytes de rat maintenus en survie *in vitro*; pour cet auteur, la « cytolysse » des mastocytes ne pourrait avoir lieu qu'en présence d'un facteur sérique thermolabile. Nous pensons que ces conditions, où le sérum apparaît comme donneur d'un co-facteur indispensable, pourraient être rapprochées de celles réalisées lorsque des concentrations relativement importantes de sérum ont été utilisées. Il est possible en effet qu'il existe dans le sérum frais un facteur labile qui se manifeste lorsqu'il est soit suffisamment concentré, soit activé au préalable. Ainsi, la formation *in vivo* d'un facteur plasmatique amino-libérateur sous l'influence du dextran a été démontrée par ARCHER (1959). Le dextran altère en effet les mastocytes chez l'animal vivant (ROWLEY et BENDITT, 1956; KELLER, 1957*b*). En l'absence de sérum frais, il est inactif sur des mastocytes isolés (LAGUNOFF et BENDITT, 1959; BAECKELAND, 1964; CRONBERG et NILSSON, 1964); comme nous l'avons démontré, il ne libère pas par lui-même l'histamine mastocytaire. Il est vraisemblable que ce facteur sérique capable de léser les mastocytes se forme, ou tout au moins devient actif, au cours des processus conduisant à la coagulation sanguine (voir p. 141). Nous reviendrons d'ailleurs plus longuement sur ces problèmes quand, dans le chapitre III, nous rapporterons nos expériences de cultures de mastocytes *in vitro*.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE II

Nous avons étudié l'action d'agents amino-libérateurs et de la réserpine sur les mastocytes péritonéaux de rat maintenus en survie. D'un point de vue morphologique, les altérations mastocytaires mises en évidence sont fort diverses : il n'y a pas d'images caractéristiques de la libération d'histamine. D'un point de vue cytochimique, les constituants mastocytaires se comportent de façon différente sous l'influence des agents pharmacodynamiques utilisés : les mucopolysaccharides ne sont pas solubilisés alors que les amines mastocytaires passent rapidement dans le milieu liquide extra-cellulaire, dès que les lésions cellulaires sont suffisamment importantes. De plus, des dosages

biologiques d'histamine indiquent qu'il existe un certain parallélisme entre la quantité d'histamine libérée et le nombre de mastocytes lésés. Cependant, de faibles quantités d'histamine peuvent être perdues par les mastocytes sans que ceux-ci paraissent altérés, du moins dans nos conditions d'observation.

Le dextran et la réserpine ne libèrent pas l'histamine mastocytaire *in vitro*. Nous avons montré que ces agents ne causent aucune altération des mastocytes dans ces conditions et que la fluorescence de ces cellules après fixation aux vapeurs de paraformaldéhyde n'est pas supprimée. Nous attirons d'ailleurs l'attention sur le fait que, d'une façon générale, la déplétion mastocytaire en 5-hydroxytryptamine, quand elle a lieu, se déroule concomitamment à celle de l'histamine.

L'ensemble de nos observations suggère qu'il n'existe pas un mécanisme unique de libération des amines mastocytaires. Pour rendre compte du phénomène, nous proposons l'hypothèse suivante : les amines biogènes qui sont stockées dans les mastocytes et plus particulièrement au niveau des granules, y sont retenues par un mécanisme exigeant l'intégrité cellulaire; toute lésion suffisamment importante du mastocyte perturbe ou inhibe ce mécanisme, de telle façon que l'histamine et la 5-hydroxytryptamine ne sont plus conservées par la cellule et se répandent dans le milieu liquide extra-cellulaire.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES MASTOCYTES NORMAUX DE RAT CULTIVÉS IN VITRO ET DES CONDITIONS NÉCESSAIRES A LEUR SURVIE

Pour réaliser de bonnes conditions d'observation des mastocytes vivants, la technique la plus simple consiste, ainsi que nous l'avons fait jusqu'à présent, à utiliser des cellules péritonéales (cf. note au bas de la p. 26) fraîchement prélevées et placées entre lame et lamelle. Nous avons eu recours à ce procédé non seulement pour décrire l'élément mastocytaire mais aussi pour étudier les effets morphologiques des amino-libérateurs. Les mastocytes placés dans ces conditions ne restent cependant pas en bon état plus de quelques heures; ainsi, il n'est donc pas possible de juger des effets que certains agents pharmacodynamiques notamment pourraient produire à plus longue échéance : l'utilité de cette technique est par conséquent limitée. Pour compléter notre connaissance des mastocytes vivants, il nous paraît indispensable de maintenir ces cellules en bon état pendant des durées prolongées et dans d'excellentes conditions d'observation. C'est pourquoi nous nous sommes efforcé de réaliser la culture de mastocytes normaux.

La mise au point d'une méthode de culture adaptée à ces cellules peut être intéressante à différents points de vue. Tout d'abord le fait que, à un moment donné, des mastocytes soient encore capables de vivre ou de survivre *in vitro* pendant des temps assez longs constitue un critère précieux pour juger de l'intégrité biologique de ces cellules à ce moment.

Rappelons que de nombreux auteurs considèrent qu'un mastocyte est en bon état en se basant sur son seul aspect morphologique : à notre sens, il s'agit en l'occurrence d'une base d'appréciation qui peut être insuffisante. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Par ailleurs, la recherche des conditions et des milieux compatibles avec une survie prolongée de ces cellules nous amènera obligatoirement à analyser les facteurs qui interviennent dans leur métabolisme spécifique; peut-être recueillerons-nous ainsi des informations supplémentaires sur le rôle que ces cellules jouent au sein des tissus normaux.

L'intérêt de disposer d'une technique de culture des mastocytes ressort également de nombreuses autres considérations. Si nous voulons aborder avec rigueur les problèmes liés à leur genèse, nous devons aussi avoir recours à cette technique. Les mastocytes sont-ils capables de se diviser, l'observation de mitoses en fournira la preuve irréfutable. Existe-t-il un processus de transformation de cellules d'un certain type en mastocytes, on en démontrera la réalité en suivant directement, sous le microscope, leur évolution complète.

Un champ de recherches particulièrement vaste s'ouvrira donc à nous si nous mettons au point une méthode de culture de mastocytes normaux ⁽¹⁾. Les difficultés de pareille entreprise sont cependant très nombreuses; elles sont en rapport, d'une part, avec la nature même des cellules en cause et, d'autre part, avec le mode de leur prélèvement. Comme nous l'avons vu précédemment, les mastocytes sont des cellules fragiles qui sont facilement lésées au cours des manipulations. Elles sont dispersées dans les tissus et les organes où elles ne représentent qu'une fraction souvent très faible de la population cellulaire totale. Il est donc très difficile d'avoir du matériel explanté constitué uniquement ou en forte proportion de mastocytes.

Il est possible d'isoler des mastocytes péritonéaux par centrifugation différentielle à partir d'une suspension de cellules recueillies par « lavage » de la cavité abdominale. Nous avons renoncé à ce procédé car nous pouvions craindre que les mastocytes mis en culture ne soient plus en bon état après pareilles manipulations d'isolement. Nous avons constaté, en effet, que des pipetages répétés de la suspension cellulaire provoquaient de graves lésions des mastocytes.

Une autre difficulté réside dans la nécessité d'utiliser des explants ou des cellules provenant d'animaux adultes. En effet,

⁽¹⁾ Nous n'envisagerons pas ici la culture des mastocytes tumoraux. Elle ne présente aucune difficulté particulière mais l'interprétation des résultats obtenus avec ce matériel est malaisée (voir *Discussion*).

le matériel embryonnaire n'est guère favorable à l'étude de la survie des mastocytes *in vitro*. Avant la naissance, les mastocytes sont relativement peu nombreux. De plus, ils ne possèdent qu'une charge réduite en granules cytoplasmiques; lorsqu'ils sont vivants, leur identification est, par conséquent, souvent malaisée sinon impossible. Il faut donc prélever le matériel à cultiver un certain temps après la naissance lorsque les mastocytes sont suffisamment nombreux et bien reconnaissables. C'est pourquoi nos prélèvements ont été effectués chez des rats âgés de 2 à 3 mois. Or, il est bien connu que le « démarrage » des cultures de tissus explantés à partir d'animaux de cet âge est souvent plus lent et plus difficile que pour les tissus d'embryons.

* * *

En dépit de ces difficultés, nous avons tenté de mettre au point une méthode de culture propre à assurer la survie prolongée des mastocytes normaux. Nous avons tout d'abord étudié le sort de ces cellules mises en culture avec les techniques et dans les milieux « habituels ». Nous avons ensuite tenté de dégager leurs exigences particulières. Voici, en résumé, les résultats de ces recherches.

1. — MÉTHODES ET MILIEUX DE CULTURE « HABITUELS »

Selon différentes modalités techniques, mais en respectant les conditions généralement recommandées pour une croissance optimale des fibroblastes, nous avons cultivé des tissus ou des suspensions cellulaires riches en mastocytes. Il s'agissait soit de fragments de mésentère soit de « cellules péritonéales » existant à l'état libre dans le liquide péritonéal. Certains des fragments de mésentère ont été découpés dans les axes vasculaires qui sillonnent la membrane mésentérique; d'autres, entre ces axes. Dans le premier cas, les explants sont épais; dans le second, ils sont minces et fragiles.

Toutes les cultures, quel qu'en soit le type, ont été examinées vivantes, en lumière ordinaire. Certaines ont été fixées à l'alcool éthylique à 80 vol. % et colorées au bleu de toluidine.

A. — CULTURES EN GOUTTE PENDANTE (MÉSENTÈRE)

Le milieu de culture généralement utilisé dans ces expériences est constitué de plasma de coq ou de rat (1/12^e), d'extrait embryonnaire de poulet (1/12^e), de sérum de coq ou de rat (1/8^e) et de liquide de Tyrode-glycosol.

Cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir une survie appréciable des mastocytes dans les explants mésentériques, que ceux-ci soient minces ou épais. Dans les cultures fixées après 24 heures, les mastocytes sont déjà tous altérés; à leur emplacement, on ne distingue plus que des débris métachromatiques.

Il n'est pas possible d'éviter la dégénérescence des mastocytes en modifiant la concentration du milieu soit en plasma, soit en sérum, soit encore en extrait embryonnaire.

B. — CULTURES EN TUBES ROULANTS (MÉSENTÈRE)

Nos observations ont porté sur environ 500 cultures maintenues en vie pendant des temps variant entre 24 heures et 25 jours.

Certaines d'entre elles ont été effectuées dans des tubes à essai ordinaires (généralement 5 explants par tube). D'autres ont été réalisées dans des tubes de Leighton; dans ce dernier cas, trois fragments de mésentère sont placés sur une lamelle introduite préalablement dans le tube; après un certain temps, cette lamelle est retirée et les cultures sont alors immédiatement fixées et colorées (voir ci-dessus). Rappelons que, pour ces cultures en tubes roulants, le milieu liquide est à base de sérum de cheval préalablement chauffé à 56 °C pendant 3 heures et d'extrait embryonnaire de poulet (pour plus de détails, voir *Matériel et Techniques*).

a) TISSUS PRÉLEVÉS AU NIVEAU DES AXES VASCULAIRES.

La croissance de ces cultures est excellente. A partir de la 30^e heure, on observe, à la périphérie de l'explant, une émigration de cellules de type fibroblastique; celles-ci ne tardent pas à se multiplier et, après 48 heures, on constate la présence de nombreuses figures mitotiques. La zone de croissance se développe régulièrement pendant les jours suivants. Après 10 jours, elle atteint en moyenne une largeur de 2 500 μ . Si, après avoir éliminé la région périphérique des cultures, on transfère ces dernières dans d'autres tubes, la croissance reprend après quelques heures et se poursuit au même rythme qu'auparavant.

Dans ces conditions, certains mastocytes survivent et restent en bon état pendant plus de trois semaines. Il n'y en a toutefois que dans l'explant originel; nous n'en avons jamais décelé au niveau de la zone de croissance (fig. 45).

Pour mettre les mastocytes en évidence dans ces explants, il est nécessaire d'avoir recours à l'examen de préparations fixées et colorées au bleu de toluidine. Identifier avec certitude ces cellules dans des cultures vivantes est en effet difficile sinon impossible. Les fragments de tissus mis en culture sont trop épais; de plus, ils contiennent une quantité considérable de fibres collagènes et de nombreuses cellules adipeuses qui masquent la présence des mastocytes. En outre, il est hasardeux de vouloir, dans ces cultures vivantes, faire la distinction entre mastocytes d'une part, histiocytes graisseux et macrophages d'autre part : les enclaves cytoplasmiques de ces deux derniers types cellulaires peuvent alors être facilement confondues avec les grains mastocytaires (voir aussi Discussion).

La morphologie des mastocytes ne semble pas se modifier sous l'influence de ces conditions de vie *in vitro*. Par ailleurs,

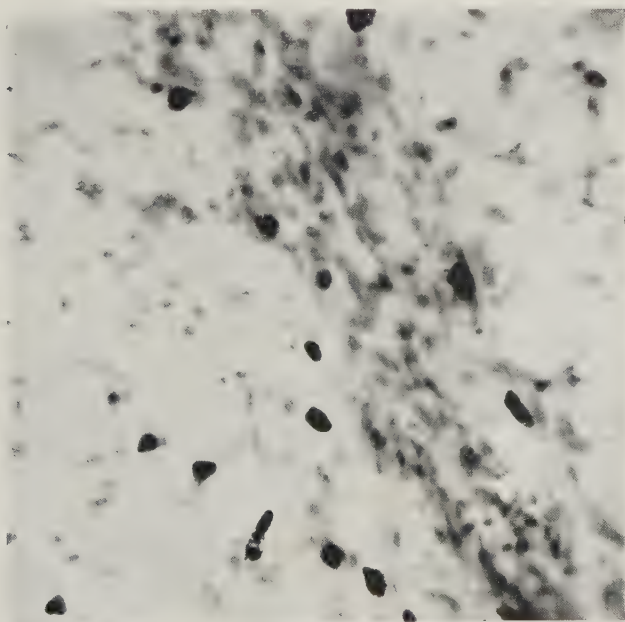


FIG. 45. Mastocytes dans un explant de mésentère de rat cultivé *in vitro* pendant 12 jours. Coloration au bleu de toluidine après fixation. Les mastocytes restent groupés comme dans l'organisme, à proximité des structures vasculaires. Quelques-uns sont dispersés dans le tissu adipeux (Agr. $\times 225$).

nous n'y avons vu aucun mastocyte en mitose, bien qu'ALLEN (1959) en ait signalé dans le mésentère *in situ* (voir p. 74).

Au fur et à mesure que la culture se prolonge, le nombre des mastocytes diminue.

A ce dernier point de vue, nous avons notamment étudié une série d'explants provenant d'un même animal, aussi semblables entre eux que possible; ils ont été cultivés pendant des laps de temps variant entre 1 et 20 jours. Les résultats ont été rassemblés dans la figure 46. Pour chaque stade, au moins 3 explants ont été examinés; dans chacun de ces derniers, les mastocytes en bon état y ont été dénombrés dans 10 champs microscopiques de $84\ 100\ \mu$ carrés, pris au hasard.

Ainsi, nous avons pu établir que *ce n'est pas progressivement* que les mastocytes disparaissent des tissus explantés. Une diminution brusque et importante de leur nombre se produit après chaque repiquage : lors du premier, qui a été pratiqué 10 jours après la mise en culture, le nombre moyen de mastocytes identifiables dans 10 champs microscopiques pris au niveau des explants originels est passé de 60 à 16; lors du second, après 19 jours, ce nombre s'est réduit de 9 à 1. Les repiquages ont donc une influence néfaste sur la survie des mastocytes.

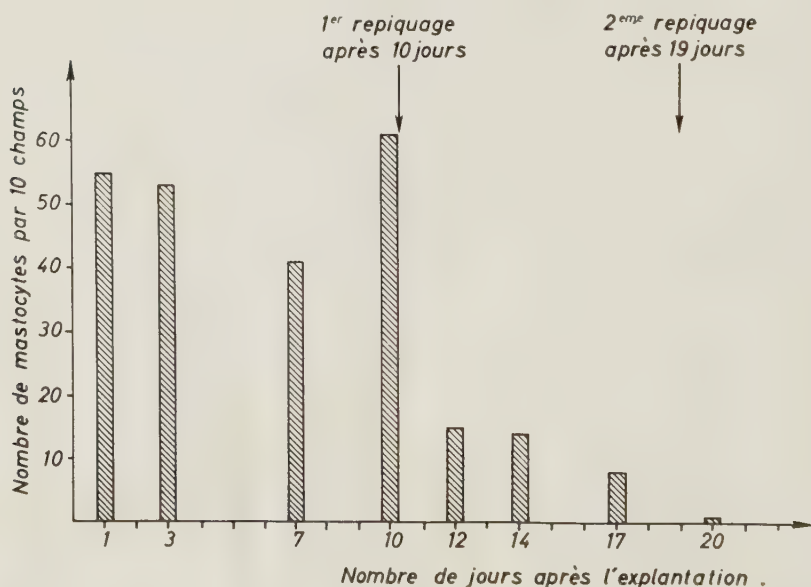


FIG. 46. Evolution du nombre des mastocytes en fonction de l'âge de la culture (en tubes roulants). Les repiquages ont eu lieu après 10 jours et 19 jours. A 10 jours, les dénombrements de mastocyte ont été faits dans des explants non repiqués.

Cette conclusion est corroborée par l'observation suivante. C'est surtout dans les cultures qui viennent d'être explantées ou repiquées que nous avons noté la présence de mastocytes dégénérés; ils apparaissent comme des amas irréguliers de matériel métachromatique granulaire entourant parfois un noyau pycnotique.

Après l'explantation ou les repiquages, nous avons également observé des cellules renfermant des masses métachromatiques, cellules qui, dans les préparations fixées et colorées au bleu de toluidine, ne peuvent être confondues avec des mastocytes. Il s'agit d'enclaves relativement peu nombreuses et présentant une métachromasie analogue à celle des granules mastocytaires mais de taille variable, assez grande, atteignant parfois plusieurs microns. Ces cellules se retrouvent surtout lorsqu'il y a dégénérescence de mastocytes; nous pensons avoir affaire ici à des macrophages ayant phagocyté des débris mastocytaires.

Remarquons enfin que nous n'avons relevé dans ces cultures aucun indice permettant de supposer qu'il pourrait exister une transformation de fibroblastes en mastocytes ou, inversement, de mastocytes en fibroblastes.

b) TISSUS PRÉLEVÉS ENTRE LES AXES VASCULAIRES.

Si les tissus ont été prélevés dans la fine membrane mésentérique qui s'étend entre les axes vasculaires, leur culture est beaucoup plus difficile et leur croissance irrégulière. La zone d'émigration est alors réduite et de largeur variable.

Ici aussi, les mastocytes ne sont identifiables que dans l'explant originel. Ils dégèrent rapidement. En effet, si on examine une préparation fixée après quelques heures de culture, on constate que déjà 40 à 50 % des mastocytes sont altérés; de toute façon, leur survie n'est, au maximum, que de 3 ou 4 jours.

Quelle que soit la nature de l'explant, la répartition topographique des mastocytes ne semble pas se modifier durant la culture. *In vivo*, ils sont surtout nombreux autour des vaisseaux (voir p. 70). Après un séjour *in vitro*, même de longue durée, certaines structures vasculaires persistent et c'est à leur voisinage qu'on observe les mastocytes survivants; rien, dans ces conditions, n'indique donc qu'ils se soient déplacés.

Certains tubes de Leighton contenant des fragments de mésentère, mis en culture selon la technique rapportée ci-dessus, n'ont pas subi de rotation et ont été maintenus stationnaires. Dans ces conditions, les mastocytes s'altèrent dès les premières heures.

C. — CULTURES DE CELLULES PÉRITONÉALES
EN FLACONS DE CARREL

Les mastocytes, qui existent en tant que cellules libres dans le liquide péritonéal, représentent normalement 2 à 6 % de la population. Ils semblent en bon état (fig. 47).

Leur prélèvement est effectué par lavage de la cavité abdominale avec la solution de Hanks (voir *Matériel et Techniques*). Contrairement à ce qui a été fait dans les expériences relatées dans les chapitres I et II, nous avons centrifugé le liquide récolté, éliminé le surnageant et remis les cellules en suspension dans 6 ml d'un milieu de culture habituel (7 parties de liquide de Hanks, 2 parties de sérum de cheval, 1 partie d'extrait embryonnaire de poulet). Cette suspension cellulaire est ensuite répartie dans 3 flacons de Carrel ou dans 2 flacons T de Earle. Dans ces derniers, on introduit généralement une lamelle avant l'ensemencement. La lamelle est retirée après un certain temps et les cellules qui y sont adhérentes sont immédiatement fixées à l'alcool éthylique à 80 vol. % et colorées au bleu de toluidine.

Peu après leur transfert dans les flacons de culture, les cellules se déposent sur le fond et y adhèrent. Si on les examine à ce moment au microscope inversé et en lumière ordinaire, il est déjà possible d'identifier les mastocytes sans risque d'erreurs en raison de leur aspect plus sombre; de plus, ils sont arrondis, globuleux et de taille supérieure à celle des autres cellules péritonéales; ils ne manifestent aucune tendance à s'étaler. Bref, leur morphologie semble normale. Si on place alors les cultures à 37 °C pendant 10 à 15 minutes, un certain nombre de mastocytes se dégranulent.

Ce phénomène a déjà été décrit au chapitre II à l'occasion d'observations effectuées au contraste de phase, sur des mastocytes fraîchement prélevés et placés entre lame et lamelle. On peut également suivre la dégranulation des mastocytes dans nos conditions de culture, en examinant les flacons de Carrel au microscope inversé en lumière ordinaire. Rappelons que cette dégranulation est en elle-même un phénomène relativement rapide et brutal qui survient sans signes morphologiques préalables, sauf peut-être une légère augmentation de taille de la cellule. Les grains cytoplasmiques sont alors éjectés un à un et ils forment rapidement une couronne autour des autres débris cellulaires. Pour chaque mastocyte, cette altération se produit en quelques minutes.

Remarquons que cette dégranulation n'affecte pas tous les mastocytes; certains n'éjectent *aucun* granule cytoplasmique.

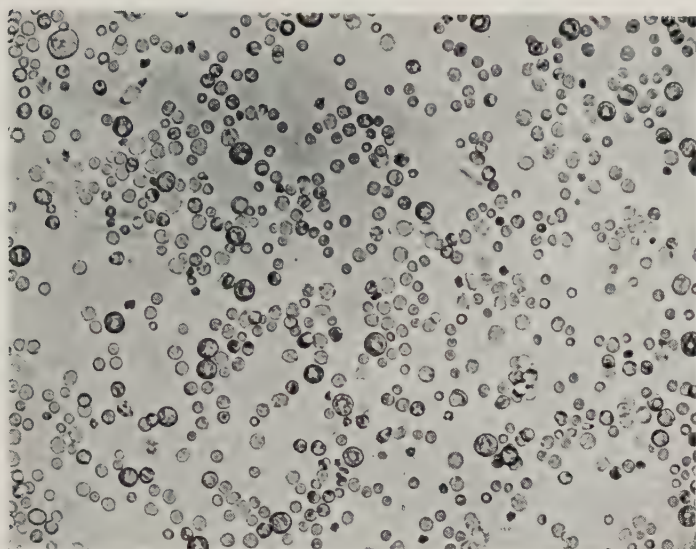


FIG. 47. Cellules péritonéales de rat, prélevées par lavage de la cavité abdominale avec du liquide de Hanks et photographiées vivantes en lumière ordinaire peu de temps après leur transfert dans un flacon de Carrel. L'identification des mastocytes est particulièrement aisée. De plus grande taille, ils paraissent sombres et bien délimités. Au centre de chacun d'eux, on voit une zone claire qui correspond au noyau. Aucune image de dégranulation n'est visible (Agr. $\times 200$).

Après une heure de culture, aucun « éclatement » ne se produit plus. Il n'est toutefois pas possible de maintenir les mastocytes longtemps en vie car ils dégénèrent rapidement, généralement en moins de 24 heures.

Au cours de cette dégénérescence, on ne note aucune projection de granules cytoplasmiques au dehors de la cellule. Lorsqu'on l'examine vivante en lumière ordinaire, celle-ci apparaît plus sombre et sa granulation est plus nette. Elle devient plus globuleuse et mûriforme. La zone claire centrale qui correspondait au noyau est masquée par les grains. Par la suite, le contour devient irrégulier et ce n'est qu'en se désagrégeant qu'elle libère ses granules dans le milieu environnant. Entretemps, le noyau est devenu pycnotique, ce qui s'observe mieux dans les préparations fixées et colorées. Il s'agit donc de lésions tardives dont les caractères morphologiques sont tout à fait différents de ceux de la dégranulation précoce. En fait, nous ne connaissons ni les raisons précises de cette dernière ni celles de la dégénérescence tardive des mastocytes.

Les débris mastocytaires sont ensuite phagocytés par des macrophages (fig. 48); pendant 2 à 3 jours, on peut retrouver des substances métachromatiques dans leur cytoplasme. Ces macrophages ne se multiplient pas, même si on continue à les entretenir, et la culture entière finit cependant par dégénérer.

D. — CULTURES DE CELLULES PÉRITONÉALES EN TUBES ROULANTS

Pour chaque prélèvement, les cellules péritonéales sont centrifugées et remises en suspension dans 6 ml de milieu de culture habituel (de composition identique à celle détaillée au paragraphe C). Cette suspension est ensuite répartie dans 3 tubes qui sont mis en rotation à 37 °C.

Après 5 à 6 heures de culture, il n'existe plus de mastocytes en bon état ni parmi les cellules en suspension dans le milieu liquide ni parmi les rares cellules qui adhèrent à la paroi.

E. — AUTRES TECHNIQUES DE CULTURE

Des cellules péritonéales ont aussi été mises en culture selon la technique proposée par PULVERTAFT et HUMBLE (1956) pour les cellules de la moelle osseuse. Ce procédé est recommandé pour la culture de cellules fortement différenciées. Il s'est cependant avéré incapable d'assurer la survie des mastocytes pendant plus de 24 heures.

D'autres essais ont été tentés en ensemençant des flacons T où nous avons introduit des lamelles recouvertes d'un gel de collagène reconstitué suivant la méthode décrite par EHRMANN et GEY (1956). Pas plus qu'avec la technique précédente, nous n'avons pu maintenir des mastocytes en vie pendant plus de 24 heures.

Dans les deux cas, un certain nombre de mastocytes « éclatent » déjà peu après leur mise en culture.

* * *

Nous venons de voir que les mastocytes peuvent être « cultivés », plus précisément être maintenus en bon état *in vitro* pendant un certain temps, notamment dans les explants de mésentère : certains d'entre eux peuvent y survivre pendant plus de 3 semaines, en conservant leur morphologie habituelle. *On peut donc dire qu'ils ne sont ni des cellules vieillies ni des éléments à vie courte.* Leur nombre diminue certes au fur et à mesure que la culture se prolonge; sans doute, ne se trouvent-ils pas dans les conditions optimales de survie. Nos résultats sont cependant sensiblement plus encourageants que ceux de BURTON

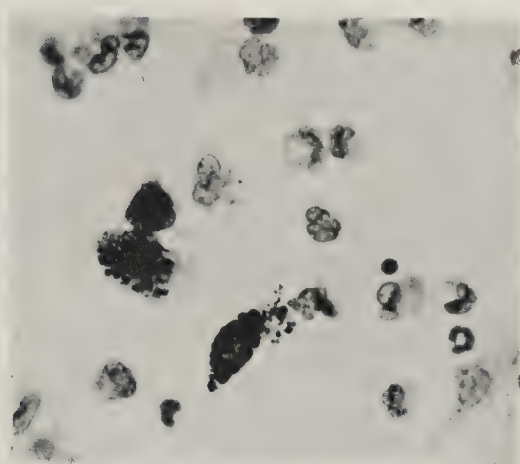


FIG. 48. Cellules péritonéales en culture (flacon T de Earle), fixées après 36 heures et colorées au bleu de toluidine. Les cellules péritonéales ont été lavées et mises en culture dans un milieu habituel. Après ce délai, tous les mastocytes sont dégénérés. Des débris de ces cellules ont été phagocytés et se retrouvent dans les macrophages comme on peut le voir sur cette figure (Agr. $\times 700$).

(1959, 1960). En effet, cet auteur n'était parvenu à maintenir les mastocytes en vie *in vitro* que pendant 4 jours au plus, dans des explants de tissu conjonctif sous-cutané.

Pour les explants de mésentère, la technique de culture la plus adéquate semble être celle des tubes roulants. Dans ce cas, diverses conditions peuvent influencer favorablement la survie des mastocytes. Le maintien en vie de ces derniers semble aller de pair avec une bonne croissance des tissus explantés en rapport, semble-t-il, avec le renouvellement constant du milieu au contact des explants, le passage continu des déchets métaboliques dans la phase liquide et la très bonne oxygénation des cellules. Dans l'état actuel de nos recherches, il est toutefois impossible de préciser si, parmi ces facteurs, certains sont plus particulièrement favorables aux mastocytes. Il est possible aussi que le grand nombre de mastocytes au sein du mésentère constitue, dans une certaine mesure, un facteur favorable à leur maintien en vie. Le volume, ou tout au moins l'épaisseur des fragments de tissus mis en culture, paraît également important. Ces cellules survivent, en effet, beaucoup plus longtemps dans des explants découpés dans les axes vasculaires du mésentère que dans ceux prélevés dans la fine membrane qui s'étend entre ces axes.

Quant à nos premiers essais de culture de mastocytes péritonéaux, ils furent plutôt décevants. Aucune de ces cellules n'a survécu plus de 24 heures. Avec ce même matériel, les résultats obtenus par BURTON ne sont pas meilleurs. En ce qui concerne la dégranulation mastocytaire que nous avons constatée pendant la première heure de culture, elle n'a été rapportée par personne avant nous. Elle doit, sans aucun doute, être mise en relation avec la présence du sérum frais qui entre dans la composition de nos milieux (voir p. 101).

Il est surprenant de constater que, cultivés dans des conditions considérées comme bonnes dans l'état actuel de nos recherches, les mastocytes présents dans des fragments de mésentère peuvent survivre plus de 3 semaines alors que les mêmes cellules provenant du liquide péritonéal ne peuvent être maintenues en vie *in vitro* plus de 24 heures. On peut dès lors se demander si le maintien des mastocytes dans leur « environnement naturel », au sein des tissus mésentériques par exemple, n'est pas la raison de la survie et du bon état de ces cellules *in vitro*. En d'autres termes, n'y aurait-il pas *in vivo*, dans les tissus riches en mastocytes, des substances qui sont indispensables à ces derniers. Ces substances n'existeraient plus dans nos cultures de cellules péritonéales puisque après la centrifugation nous avons éliminé le surnageant, c'est-à-dire le liquide péritonéal, milieu naturel des mastocytes (voir paragraphe 3).

Cette hypothèse admettant le rôle d'un « facteur » tissulaire essentiel à la survie de ces cellules peut expliquer, dans une certaine mesure, la dégénérescence à très longue échéance des mastocytes dans les explants de mésentère cultivés en tubes roulants : ce facteur, primitivement présent, disparaîtrait progressivement. Par ailleurs, il est possible qu'il ne soit pas « retenu » aussi longtemps dans des explants minces que dans des explants épais, d'où une dégénérescence beaucoup plus rapide des mastocytes dans le mésentère découpé entre les axes vasculaires.

* * *

Ces premiers résultats montrent que la culture de mastocytes se heurte à deux difficultés majeures : d'une part, leur *dégranulation* qui, fréquemment, se déclenche peu après la mise en culture et consiste en l'expulsion brutale et rapide de

grains au-dehors de la cellule; d'autre part, une *dégénérescence* cellulaire de type plus banal qui se produit à plus ou moins long terme, sans dégranulation. Il importera donc de rechercher, avant tout, les moyens de retarder le plus possible l'apparition de ces deux phénomènes ou, mieux encore, de les éviter.

Nos recherches seront désormais poursuivies à l'aide de mastocytes péritonéaux. En effet, bien que, dans les conditions utilisées jusqu'à présent, leur survie soit relativement brève, leur observation dans les cultures vivantes est très aisée. Dans les explants vivants de mésentère, l'identification des mastocytes est plus difficile sinon quasi impossible : ils peuvent être confondus avec des histiocytes graisseux, par exemple (voir plus haut). Au contraire, dans les cultures de cellules péritonéales, on distingue aisément les mastocytes des autres cellules et on peut étudier leurs altérations morphologiques dans de bonnes conditions.

2. — ÉTUDE DE LA DÉGRANULATION DES MASTOCYTES LORS DE LA MISE EN CULTURE ACTION D'UN FACTEUR SÉRIQUE THERMOLABILE

Au cours de nos recherches sur les substances amino-libératrices, nous avons montré que le sérum frais de veau, à concentration supérieure à 10 %, peut provoquer la dégranulation des mastocytes péritonéaux; ils libèrent alors leur histamine (voir p. 114).

Tous les sérums sont doués d'un pouvoir dégranulant, quelle que soit l'espèce animale dont ils proviennent.

Les activités des sérums de poulet, de rat, de cobaye, de veau, de poulain ou d'homme ont été comparées. Sans entrer ici dans les détails de cette expérimentation, disons seulement que nous avons observé des mastocytes dégranulés en moins grand nombre avec du sérum de poulain et en plus grand nombre avec du sérum de veau. De nombreuses autres recherches ont été effectuées. C'est ainsi que, pendant un an, nous avons noté l'activité d'un certain nombre de sérums de veau, en fonction de leur concentration dans le milieu. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune influence saisonnière ou autre.

Pour nos recherches concernant la dégranulation, nous avons utilisé du sérum de veau, uniquement pour des raisons pratiques.

A. — MOYENS DE SUPPRIMER
L'ACTIVITÉ DÉGRANULANTE DU SÉRUM

Il est possible de prévenir la dégranulation provoquée par le sérum en refroidissant les cultures à 4 °C immédiatement après la mise en culture.

Maintenus à cette température, les mastocytes restent en bon état même pendant des heures. Si, après ce refroidissement, la culture est placée dans une étuve à 37 °C, ils commencent à se dégranuler une quinzaine de minutes plus tard. Cette inhibition des processus de dégranulation n'est donc que transitoire.

Existe-t-il une relation entre l'activité dégranulante du sérum et son vieillissement ?

Une telle relation nous a été suggérée par deux observations. Premièrement, nous avons rencontré un échantillon exceptionnel de sérum dépourvu d'activité dégranulante : son stockage habituel au congélateur à —20 °C avait été fortuitement interrompu pendant plusieurs jours. Deuxièmement, lorsque du sérum est réchauffé à la température du laboratoire et remis au réfrigérateur à 4 °C à plusieurs reprises, nous avons noté une perte progressive de son pouvoir dégranulant.

Différents échantillons provenant du même stock de sérum (dont l'activité, après stockage au congélateur à —20 °C, était incontestable) ont délibérément été portés et maintenus à différentes températures. Après séjour à 4 °C même pendant plusieurs semaines, le sérum peut encore provoquer une dégranulation des mastocytes. Au contraire, son activité disparaît s'il est conservé soit une semaine à la température du laboratoire soit 2 jours à 37 °C, soit encore 20 minutes à 56 °C.

Il est donc possible, nous l'avons vérifié maintes fois depuis lors, de mettre des cellules péritonéales en culture sans risque de dégranulation des mastocytes. Il suffit que le sérum utilisé pour la culture ait été maintenu préalablement à une certaine température pendant un temps suffisamment long (voir plus haut). Afin de ne pas altérer trop profondément le sérum, nous avons habituellement eu recours pour les expériences ultérieures à du sérum maintenu à 37 °C pendant 72 heures. Ainsi, nous sommes certains que le facteur sérique thermolabile provoquant la dégranulation mastocytaire a été inactivé.

B. — ORIGINE DU FACTEUR DÉGRANULANT

On peut se demander si le facteur dégranulant du sérum frais existe déjà dans le plasma sanguin ou si, au contraire, il apparaît, du moins sous sa forme active, pendant les processus de la coagulation ou de la fibrinolyse qui suit cette dernière. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mis du plasma sanguin au contact de mastocytes péritonéaux et nous avons provoqué ou retardé sa coagulation de différentes façons.

Des cellules péritonéales ont été déposées sur lamelle; du plasma de poulet ou de rat ⁽¹⁾ ainsi que différentes substances dont nous voulions étudier les effets ont été amenés au contact des cellules. Ces préparations ont ensuite été traitées par une méthode inspirée des techniques habituelles de culture en goutte pendante et placées à 37 °C.

Les résultats sont concordants, que l'on utilise du plasma de coq ou du plasma de rat (voir, dans le tableau VI, quelques données recueillies lors de l'emploi du premier de ces plasmas). Aussi longtemps que le plasma ne se coagule pas, par exemple s'il est fortement hépariné et si on n'y ajoute ni extrait embryonnaire ni thrombine, aucune dégranulation ne se produit. Cependant, dès qu'on provoque la coagulation, par exemple par addition d'extrait embryonnaire ou de thrombine, les mastocytes éclatent. Il faut donc que le plasma sanguin coagule pour que ce phénomène ait lieu. Les lésions se manifestent d'autant plus vite que la concentration en plasma est plus élevée. *Bref, un agent capable de provoquer la dégranulation apparaît au cours des processus accompagnant la coagulation du plasma sanguin. Cet agent reste actif dans le sérum qui exsude du caillot.*

L'action de l'héparine se borne-t-elle au simple fait d'empêcher la coagulation du plasma ou bien cette substance possède-t-elle en plus le pouvoir d'inactiver un facteur dégranulant existant dans le sérum, comme nous l'avons vu plus haut (p. 101). Pour répondre à cette question, nous avons placé des mastocytes dans un milieu contenant à la fois du sérum frais et de l'héparine.

⁽¹⁾ La fluidité du plasma a été maintenue grâce à de l'héparine ajoutée au sang, lors du prélèvement, à la concentration de 1/100 000 (sang de coq) ou de 1/10 000 (sang de rat).

TABLEAU VI. Action du plasma de coq, en voie de coagulation ou non, sur les mastocytes péritonéaux de rat.

Substances mises au contact des mastocytes	N° de la préparation	Délais entre le dépôt sur la lamelle des substances et l'examen de la préparation									
		5 min	10 min	20 min	30 min	45 min	1 h	2 h	3 h		
1/2 vol. plasma 100 % + 1/2 vol. thrombine 1/1 000	1	+	+								
	2	+	+								
	3	+	+								
1/2 vol. plasma 33 % + 1/2 vol. thrombine 1/1 000	4	0	+	+	+						
	5	0	0	+	+						
	6	0	0	+	+						
1/2 vol. plasma 11 % + 1/2 vol. thrombine 1/1 000	7	0	0	0	0	0	0	0	0		
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	+	
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
Plasma ^a 50 %	10	0	0	+	+	+					
Plasma 50 % hépariné à 1/10 000	11	0	0	0	0	0	0	0	0		
Thrombine ^b 1/1 000	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Il s'agit de plasma de poulet hépariné au 1/100 000. Dilutions avec du liquide de Hanks.^b Solution extemporanée de « Topostasine Roche » dans du liquide de Hanks.

0 : pas de dégranulation;

+ : dégranulation de quelques mastocytes;

++ : dégranulation de la majorité des mastocytes;

+++ : dégranulation de tous les mastocytes.

Des cellules péritonéales ont été mises en présence d'un milieu de culture habituel constitué de 5 parties de NCTC 109, de 3 parties de sérum de cheval (dont l'activité dégranulante avait été contrôlée au préalable) et de 2 parties de liquide de Earle. Nous y avons ajouté de l'héparine, aux concentrations de 0,01, 0,1, 0,5, 1 et 2 mg par ml.

Quelle que soit la concentration, on constate que la majorité des mastocytes expulsent leurs granules. Il semble donc que ce mucopolysaccharide n'est pas capable d'inactiver le facteur sérique dégranulant après sa formation au cours des processus qui accompagnent ou suivent la coagulation sanguine ⁽¹⁾.

C. — INHIBITION DE LA DÉGRANULATION PAR LES IONS SULFATE

Nous avons vu qu'après injection intraveineuse de sulfate de sodium, les mastocytes sont plus nombreux dans les prélèvements de cellules péritonéales (voir *Matériel et Techniques*). Nous nous sommes alors demandé si le même effet serait obtenu en enrichissant en ions sulfate le liquide utilisé pour laver la cavité péritonéale (un dixième de ce liquide était constitué par une solution de sulfate de sodium ou de potassium isotonique). Incidemment, au cours de ces expériences, nous avons fait une constatation d'un autre ordre. Si, à une suspension de cellules péritonéales ainsi prélevées, nous ajoutons du sérum frais, nous ne constatons aucune lésion mastocytaire alors que, à la même concentration, l'addition de sérum provoque la dégranulation des mastocytes dans un milieu non enrichi en ions sulfate.

Nous avons tenté de préciser ces résultats. Dans ce but, des cellules péritonéales fraîchement prélevées avec du liquide G de Puck ont été mises en présence, dans des flacons de Carrel, soit de sérum frais soit de plasma de coq, à différentes concentrations. Pour une moitié des expériences, le milieu a été uniquement complété avec du NCTC 109; pour l'autre moitié, le milieu a été additionné de solution « S » (voir *Matériel et Techniques*) à raison de 10 % et complété également avec du NCTC 109. Les observations ont été faites après 1 heure à 37 °C.

L'enrichissement du milieu en ions sulfate s'oppose à la dégranulation, quelle que soit la teneur du milieu en sérum. Rappelons qu'en l'absence de solution « S », les mastocytes éclatent pour des concentrations en sérum supérieures à 10 %.

⁽¹⁾ L'effet d'autres mucopolysaccharides acides a été étudié. Le sérum conserve également ses propriétés dégranulantes envers les mastocytes après addition au milieu d'acide chondroïtine-sulfurique (à la concentration de 0,1 et 5 mg/ml) et d'acide hyaluronique (à la concentration de 0,1, 0,5 et 1 mg/ml).

En ce qui concerne la dégranulation provoquée par le plasma de coq, elle est également prévenue dans une certaine mesure par les ions sulfate.

C'est ainsi que si, normalement, les mastocytes se dégranulent en présence de 2 % de plasma (fig. 49), ils ne le font plus lorsqu'on a ajouté 10 % de solution « S » au milieu. Cependant, si le pourcentage de plasma est plus élevé et atteint 10 %, on peut observer une dégranulation des mastocytes, en dépit de l'addition de solution « S ».

* * *

En conclusion, si nous voulons composer des milieux de culture à base de sérum, il est indispensable soit d'inactiver le facteur thermolabile qui provoque la dégranulation, en plaçant par exemple le sérum frais pendant 3 jours à 37 °C, soit d'enrichir le milieu de culture en ions sulfate. Si nous voulons cultiver des mastocytes dans des milieux à base de plasma, nous devons ajouter de l'héparine à dose suffisante pour empêcher toute coagulation.

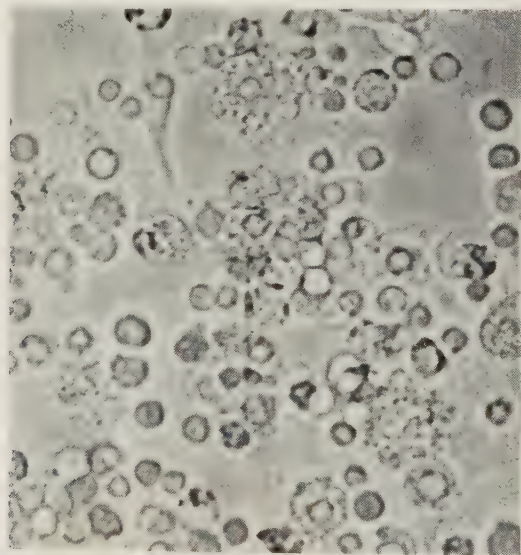


FIG. 49. *Altérations mastocytaires après addition de plasma de coq frais non hépariné.* Microphotographie en lumière ordinaire. Des cellules péritonéales ont été prélevées par lavage de la cavité abdominale avec une solution saline isotonique. Après transfert dans des flacons de Carrel, les cellules se sont déposées sur le fond. Le liquide de prélèvement a été ensuite retiré à la pipette et remplacé par du milieu NCTC 109 additionné de plasma à la concentration finale de 2 %. Sur cette figure, on peut voir qu'après un séjour de 15 minutes à 37 °C, la plupart des mastocytes sont dégranulés (Agr. $\times 550$).

3. — RECHERCHE DES FACTEURS FAVORABLES A LA SURVIE PROLONGÉE DES MASTOCYTES ESSAI DE MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE CULTURE

Nous avons précédemment émis l'hypothèse que la survie des mastocytes *in vitro* serait liée à la persistance dans les explants de substances présentes dans les tissus au moment de la mise en culture. On peut aussi se demander si le liquide péritonéal, milieu où vivent des mastocytes à l'état de cellules libres, renfermerait aussi de telles substances.

A. — EXISTENCE DANS LE LIQUIDE PÉRITONÉAL DE SUBSTANCES FAVORABLES A LA SURVIE DES MASTOCYTES

Voyons tout d'abord si ces substances existent dans le liquide péritonéal. Dans ce but, réalisons des cultures de mastocytes, d'une part en présence, d'autre part en l'absence de ce liquide. Afin que l'interprétation de nos résultats soit plus facile, le milieu ne contient pas de sérum et est uniquement constitué par une solution nutritive exempte de protéines, le NCTC 109 de marque « Difco » ⁽¹⁾.

a) SURVIE DES MASTOCYTES EN PRÉSENCE DE LIQUIDE PÉRITONÉAL.

Si nous voulons cultiver des mastocytes en présence de liquide péritonéal, le moyen le plus simple est d'utiliser le milieu de culture lui-même pour « laver » la cavité abdominale et prélever les cellules. La solution nutritive NCTC 109 est donc injectée dans l'abdomen; elle est ensuite retirée à la pipette et transférée, sans centrifugation, dans des flacons de Carrel où les cellules, qui étaient en suspension, se déposent. Le milieu de culture ainsi constitué consiste donc en solution NCTC 109 additionnée du liquide péritonéal présent dans la cavité abdominale au moment de l'injection.

(1) La constitution du NCTC 109 est extrêmement complexe : plus de 70 substances différentes, entre autres des acides aminés et des vitamines, entrent dans sa composition. Cette solution permet de maintenir des cellules en vie *in vitro* pendant plusieurs jours. Recommandée notamment par PAUL (1959), elle a même permis à McQUILKIN et ses collaborateurs (1957) d'obtenir une prolifération active de fibroblastes (L strain) en l'absence de sérum.

Les mastocytes paraissent morphologiquement normaux lors de leur mise en culture et le restent pendant plus de 24 heures. Toutefois, leur nombre diminue progressivement : alors que, après 3 jours, on constate que plus de 60 % sont encore vivants et en bon état, après 5 jours, le nombre des survivants est minime.

Du point de vue morphologique, nous n'avons observé, en cours de culture, ni éclatement ni expulsion de granules isolés; pourtant, la granulation cytoplasmique de certains d'entre eux devient plus grossière, le noyau n'est plus apparent : il s'agit de mastocytes altérés qui, le plus souvent, seront bientôt phagocytés. D'une manière générale, après 3 jours de culture, les mastocytes ont diminué de taille. Leur diamètre moyen, de 12 à 14 μ à la mise en culture, se réduit à moins de 10 μ . Après fixation et coloration par le bleu de toluidine, les mastocytes survivants ont un aspect normal, bien qu'ils soient plus petits.

Les autres cellules adhèrent au verre et s'étalent. Elles restent toujours de taille relativement petite. Peu à peu, mais plus lentement que les mastocytes, leur nombre se réduit; jamais elles ne se divisent.

Si, après 24, 48 ou 72 heures de culture, le milieu est retiré à la pipette et remplacé par du NCTC 109 frais, la disparition des mastocytes s'accélère et, 24 heures après ce changement de milieu, plus un seul n'est en bon état. De plus, à l'examen macroscopique, un dépôt légèrement blanchâtre apparaît sur le fond du flacon.

b) SURVIE DES MASTOCYTES EN L'ABSENCE DE LIQUIDE PÉRITONÉAL.

Comme dans les expériences rapportées ci-dessus, nous prélevons les cellules péritonéales avec de la solution nutritive NCTC 109, ensuite nous centrifugeons deux fois en éliminant le liquide surnageant et enfin nous remettons les cellules en suspension dans du NCTC 109 frais.

Examinées au microscope en lumière ordinaire avant d'être placées à 37 °C, ces cellules « lavées » présentent une morphologie normale (fig. 50). Après 4 à 5 heures d'incubation à 37 °C, certains mastocytes se sont étalés. Leur contour s'est estompé sur une partie ou sur tout le pourtour cellulaire (fig. 51). Les granules cytoplasmiques paraissent plus gros. La zone nucléaire reste bien visible; dans un certain nombre de cas, on distingue même nettement le noyau. Pourtant, déjà à ce stade, une coloration au bleu de toluidine nous a permis de voir un noyau rétracté, intensément coloré et parfois pycnotique, alors que les granules mastocytaires restent franchement métachromatiques. Au cours des heures suivantes, les granules continuent à grossir (fig. 52) et la cellule finit par se désagréger; tous les mastocytes subissent les mêmes modifications.

Après 12 heures, il n'y en a plus en bon état dans la préparation (fig. 53). Au fur et à mesure que les mastocytes dégénèrent, les autres cellules péritonéales qui, dès la mise en culture, s'étaient parfaitement étalées, présentent divers signes de souffrance; finalement, elles s'arrondissent mais restent vivantes.

FIG. 50

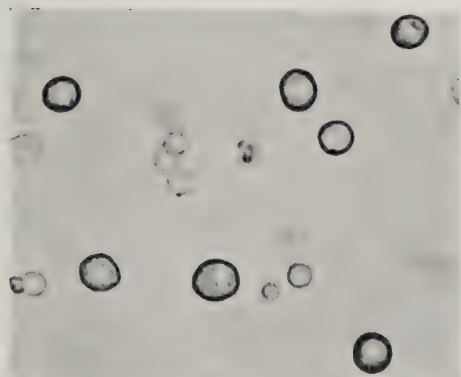


FIG. 51

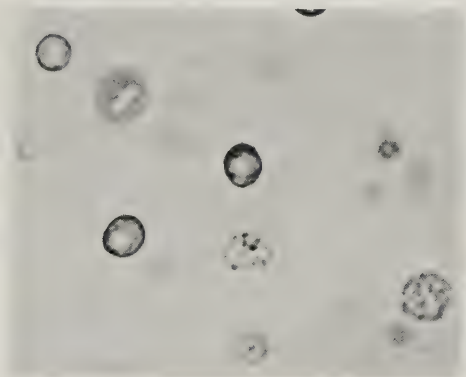
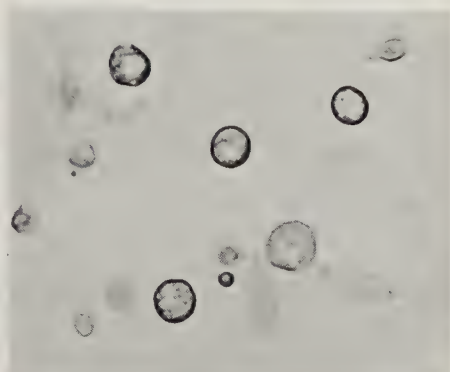


FIG. 53



FIG. 52

FIG. 50 à 53. Modifications des mastocytes « lavés », maintenus à 37 °C, dans un milieu de culture synthétique dépourvu de protéines. Microphotographies en lumière ordinaire. (Agr. $\times 440$).

FIG. 50, en haut et à gauche : avant l'incubation, les mastocytes apparaissent très sombres, bien délimités et en bon état.

FIG. 51, en haut et à droite : après 5 heures, la plupart des mastocytes conservent une morphologie normale mais certains — comme celui qui se trouve au centre de la figure — s'étalent et leur contour commence à s'estomper.

FIG. 52, en bas et à gauche : après 8 heures, dans les mastocytes étalés — qui sont maintenant de plus en plus nombreux — apparaissent de gros granules.

FIG. 53, en bas et à droite : après 12 heures, on ne distingue plus que des débris de mastocytes constitués principalement par des amas de granules fortement gonflés.

La survie des mastocytes « lavés » et maintenus à 37 °C dans un milieu constitué uniquement par du NCTC 109 n'est que de quelques heures. L'élimination de certaines substances présentes dans le liquide de prélèvement semble être ici la cause de la dégénérescence rapide des mastocytes. Remarquons que, dans ces conditions, quand le sérum est absent du milieu, aucune dégranulation ne se manifeste au niveau des mastocytes.

* * *

Les mastocytes « lavés » peuvent cependant être maintenus en vie au moins 24 heures dans du NCTC 109, si on ajoute à ce dernier un peu du liquide décanté après la première centrifugation (voir tableau VII).

Ce liquide peut être considéré comme du liquide péritonéal fortement dilué par la solution injectée dans l'abdomen. La dilution serait d'environ 1/50; en effet, PADAWER (1963) estime que, chez le rat, le volume du liquide péritonéal n'excède normalement pas 0,2 ml; nous diluons ces 0,2 ml par l'injection de 10 ml de solution physiologique (voir *Matériel et Techniques*).

En dépit de cette dilution, l'activité du liquide décanté est considérable. Les mastocytes peuvent en effet être maintenus en survie pendant au moins un jour lorsque le milieu est constitué de 90 % de NCTC 109 et de 10 % seulement de liquide décanté.

On peut cependant se demander si le liquide de « lavage » n'extraîrait pas des tissus environnants le ou les facteurs favorables à la survie des mastocytes *in vitro*.

* * *

TABLEAU VII. Influence du liquide retiré de la cavité péritonéale sur la survie *in vitro* de mastocytes « lavés ».

Liquide de prélèvement incorporé (en vol. %)	Nombre d'expériences	Etat des mastocytes après incubation de 24 h à 37°
4 %	8	30 à 60 % de mastocytes lésés
10 %	3	plus de 90 % de mastocytes intacts
20 %	1	id.
40 %	2	id.

Nous avons également étudié certains caractères de la fraction active du surnageant recueilli après la première centrifugation.

Le liquide surnageant a été traité de différentes manières : séjour au réfrigérateur à 4 °C pendant 2 jours; à l'étuve à 37 °C pendant 2 jours; à 60 °C pendant 3 heures; il a été également porté à ébullition. Sauf dans ce dernier cas, le liquide conserve ses propriétés protectrices : la grande majorité des mastocytes mis en culture dans un milieu constitué de 80 % de NCTC 109 et de 20 % de surnageant soumis à l'un ou l'autre de ces traitements sont encore bien vivants après 24 heures. Après ébullition, pendant laquelle nous avons noté la précipitation de certaines substances, le liquide de prélèvement n'assure plus une protection aussi efficace; après 24 heures, 30 à 50 % sont lésés.

Le ou les facteurs assurant la survie des mastocytes *in vitro* sont donc relativement thermostables.

En conclusion, *il existe dans l'environnement naturel des mastocytes de l'organisme, et plus particulièrement dans le liquide péritonéal, des substances indispensables à leur survie in vitro; elles sont thermostables.* Pour cultiver les mastocytes péritonéaux, nous devons donc nous efforcer de constituer un milieu contenant certaines substances présentes dans le liquide péritonéal.

Le milieu NCTC 109 qui, on le sait, est un milieu synthétique complexe mais exempt notamment de protéines, peut ne pas satisfaire à toutes les exigences nutritives des cellules péritonéales en vue d'une culture à long terme. Dans le but de fournir à nos cellules un milieu plus proche des milieux naturels, nous avons tout d'abord procédé à des essais de culture de mastocytes en présence de sérum; pour des raisons exposées plus haut, nous avons préalablement fait séjourner ce sérum pendant 3 jours à 37 °C.

B. — CULTURE DE MASTOCYTES PÉRITONÉAUX EN PRÉSENCE DE SÉRUM

a) PREMIÈRE MÉTHODE.

Nous venons d'insister sur la nécessité d'introduire dans le milieu de culture des mastocytes péritonéaux certaines substances présentes dans leur environnement « naturel », c'est-à-dire dans le liquide péritonéal. Du milieu à base de sérum (dont l'activité dégranulante a été supprimée par passage à 37 °C)

est injecté préalablement dans la cavité abdominale du rat à raison de 10 ml puis retiré à la pipette et utilisé pour la culture (comme nous l'avons déjà signalé plus haut pour le NCTC 109). La suspension de cellules péritonéales ainsi obtenue est mise telle quelle en culture.

Deux milieux de culture ont été utilisés. L'un était constitué de : 2 parties de sérum ayant séjourné préalablement 3 jours à 37 °C, 1 partie d'extrait embryonnaire de poulet, 7 parties de liquide de Hanks; l'autre de : 3 parties de sérum ayant également séjourné à 37 °C, 5 parties de NCTC 109 et 2 parties de liquide de Earle. Des lamelles amovibles ont été placées dans un certain nombre de flacons T de Earle. Elles ont été prélevées après différents temps de culture. Après fixation, des préparations ont été colorées par le bleu de toluidine.

Peu après le transfert des cellules péritonéales dans les flacons, les cultures ressemblent à celles effectuées dans des conditions comparables avec un milieu uniquement constitué de la solution nutritive NCTC 109. Mais bientôt, une différence se marque : alors que, avec le NCTC 109 seul, certains mastocytes dégénèrent déjà après 24 heures, ici, les mastocytes survivent pendant 3 ou 4 jours mais les cultures semblent comme figées.

On n'observe aucune modification morphologique des mastocytes, que ce soit à l'examen direct ou après fixation et coloration (fig. 54). Ils ne paraissent pas mobiles. Les autres cellules augmentent progressivement de taille; cependant, leur étalement sur le verre progresse à peine.

Après 4 à 5 jours, généralement peu après un renouvellement de milieu, il est habituel de constater, à l'examen macroscopique des flacons de culture, qu'une sorte de « voile » mince et fragile flotte dans le milieu. Si on examine ces cultures au microscope, on se rend compte qu'il n'y a plus que quelques cellules qui sont restées adhérentes au verre. La plupart — entre autres, presque tous les mastocytes — se sont détachées et sont incluses dans la substance amorphe, translucide et non colorable qui constitue le voile. En fait, il s'agit d'un mince dépôt qui s'était formé puis « gélifié » sur le fond du flacon et qui, en cours de culture, s'est décollé sans se désagréger. Maintenu dans le flacon d'origine ou transféré dans un autre récipient avec du milieu neuf, le voile ne se refixe jamais au fond du flacon. D'autre part, les cellules qui s'y trouvent — notamment les mastocytes — dégénèrent toujours très rapidement.

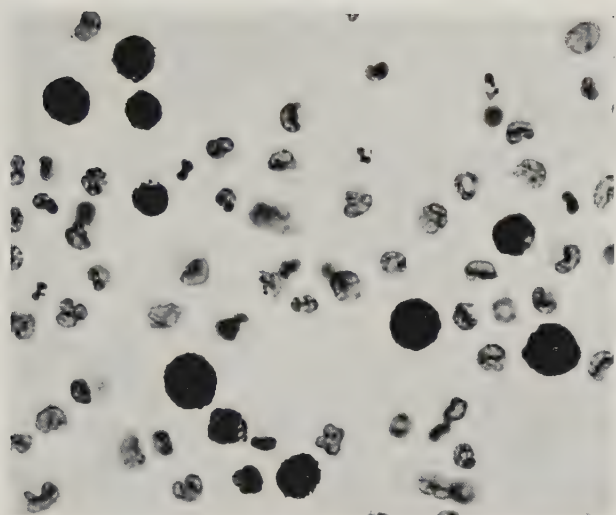


FIG. 54. *Mastocytes péritonéaux de rat in vitro*. Coloration au bleu de toluidine après fixation. Culture de 6 heures réalisée en utilisant le milieu de culture comme liquide de prélèvement. L'intensité de la coloration métachromatique permet à peine de distinguer la granulation cytoplasmique des mastocytes qui apparaissent ici comme des masses sombres arrondies. Noter l'aspect très polymorphe et le noyau souvent très irrégulier des autres cellules (Agr. $\times 700$).

Peu de temps après l'élimination du voile, les rares cellules restées adhérentes au verre commencent à s'étaler. Elles prennent l'aspect habituel de fibroblastes avec un gros noyau ovoïde possédant des nucléoles bien visibles (fig. 55 et 56). Rapidement, elles entrent en mitose et se multiplient (fig. 57). Tous les mastocytes ont alors disparu depuis longtemps.

Les fibroblastes recouvrent progressivement tout le fond du flacon. Une dizaine de jours après le détachement du voile, le tapis cellulaire est devenu tellement dense qu'on est contraint, si on veut poursuivre la culture, de libérer les cellules par « trypsinisation » et de les transférer dans d'autres flacons. Il est ainsi possible de poursuivre la culture de ces cellules pendant des temps très longs, sans modifier la composition du milieu.

Si, à ces cultures de fibroblastes d'origine péritonéale en croissance active, nous ajoutons une suspension fraîche de cellules de même provenance où se trouvent donc un certain nombre de mastocytes, la multiplication des fibroblastes s'arrête brusquement. Les mastocytes introduits dans la culture montrent en quelques heures des signes d'altération et sont rapidement phagocytés par des macrophages. On peut également observer que les fibroblastes changent d'aspect ; sur le vivant et en lumière ordinaire, leur cytoplasme s'opacifie ; leur noyau n'est plus visible ; ils tendent à s'arrondir ; finalement, la culture dégénère.

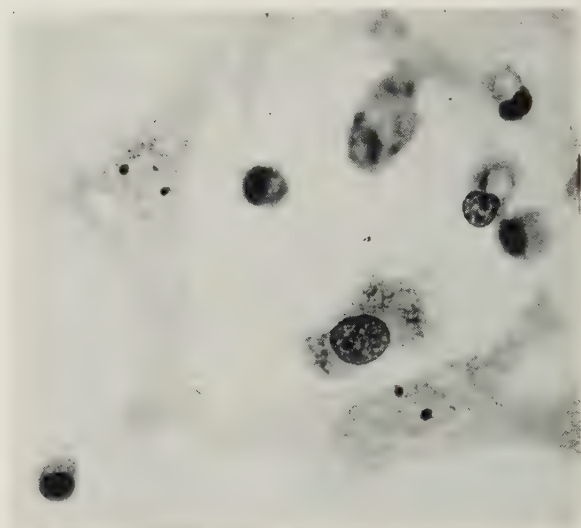


FIG. 55. *Modifications morphologiques de cellules péritonéales après l'élimination des mastocytes dans une culture de 8 jours. Coloration au bleu de toluidine après fixation. Cultivées dans les conditions habituelles de milieu, les cellules péritonéales n'acquièrent un aspect fibroblastique que lorsque les mastocytes ont disparu de la culture. Noter, ici dans la figure, des cellules à différents stades de leur évolution en fibroblastes fortement étalés, à noyau ovoïde avec nucléoles bien visibles et à cytoplasme libre d'enclaves et de vacuoles (Agr. $\times 700$).*

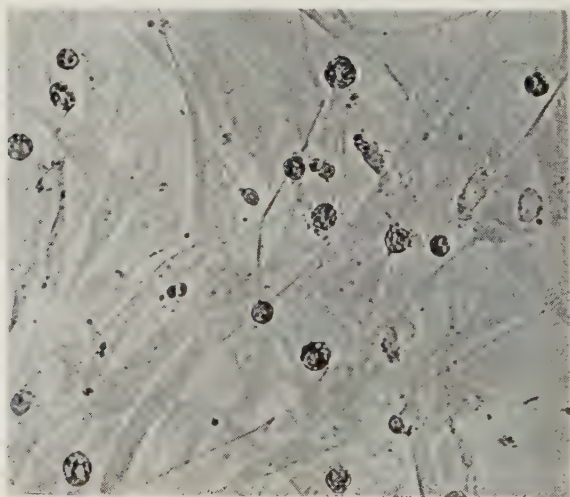


FIG. 56. *Cellules d'origine péritonéale photographiées vivantes en lumière ordinaire dans une culture âgée de 10 jours. Après l'élimination des mastocytes, de très nombreux fibroblastes s'étalent sur le verre et vont recouvrir progressivement tout le fond du flacon de Carrel. Sur un plan légèrement supérieur, des cellules rondes du type macrophage. A l'observation, ces dernières cellules se révèlent très mobiles et peu adhérentes au verre ou aux fibroblastes (Agr. $\times 332,5$).*

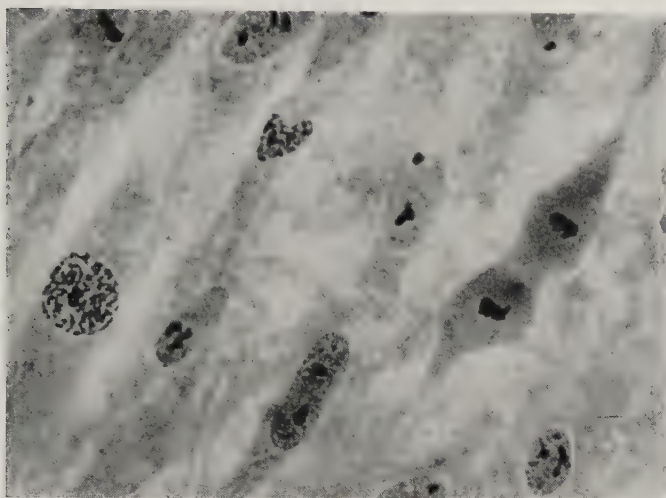


FIG. 57. Cellules péritonéales de type fibroblastique en croissance active après 14 jours de culture. Coloration au bleu de toluidine après fixation. Noter la présence, sur cette microphotographie, d'une prophase et d'une télophase (Agr. $\times 700$).

Bref, en cultivant les cellules péritonéales selon cette première technique, nous avons réalisé des conditions telles qu'il s'y forme une mince pellicule de substances déposées dans laquelle sont enrobées les cellules. Parmi les constituants du milieu gélifié sur le fond du flacon, se trouvent probablement les « facteurs » qui se sont révélés être indispensables à la survie des mastocytes; en effet, tant que ces derniers s'y trouvent inclus, ils restent en bon état; par contre, les très rares mastocytes qui, après 4 ou 5 jours de culture, ne se détachent pas du fond du flacon avec le voile, dégénèrent rapidement.

b) SECONDE MÉTHODE.

Une suspension de cellules péritonéales a été prélevée avec du liquide G de Puck et laissée à la température du laboratoire dans des flacons de Carrel. Après 15 à 30 minutes, le surnageant a été retiré à la pipette et remplacé par un milieu constitué de 50 % de sérum ayant préalablement séjourné 3 jours à 37 °C et de 50 % de la solution nutritive NCTC 109. Dans ces conditions, la survie de la très grande majorité des mastocytes est assurée pendant 3 jours (fig. 58, 59 et 60). Leur morphologie

reste normale. Les autres cellules s'étaient peu; rares sont celles qui prennent l'aspect habituel de fibroblastes.

Par ailleurs, à la longue, les cellules se rassemblent en amas à certains endroits; ce phénomène semble résulter de la lyse progressive d'un « film » de matériel à peine visible dans lequel les cellules paraissent incluses : quand on manipule assez brutalement les flacons, on peut en effet observer qu'un grand nombre de cellules peuvent être brusquement emportées à une certaine distance par la rétraction du film. Dans ces conditions, les mastocytes changent certes de localisation mais leurs déplacements sont tout à fait passifs. Remarquons qu'alors leur répartition dans la culture devenant très hétérogène, le nombre des survivants est difficile à déterminer.

Si, au cours des jours suivants, nous ne renouvelons pas le milieu, des altérations apparaissent au niveau des mastocytes.

Ces derniers ne présentent aucun signe de dégranulation et sont de taille normale mais leur contour est irrégulier et déchiqueté. Leurs granules cytoplasmiques, plus gros et plus sombres que ceux des mastocytes en bon état, masquent presque totalement le noyau. Ces mastocytes altérés vont mourir, peut-être sont-ils déjà morts. Après coloration au bleu alcian-Kernechtrot, leur noyau apparaît pycnotique. Aussi bien lors des examens directs sur le vivant qu'au cours de l'étude de préparations fixées et colorées, nous avons pu observer que des mastocytes en mauvais état sont phagocytés par des macrophages. Notons aussi que, dans ces conditions, une certaine quantité d'histamine est libérée dans le milieu (voir p. 165).

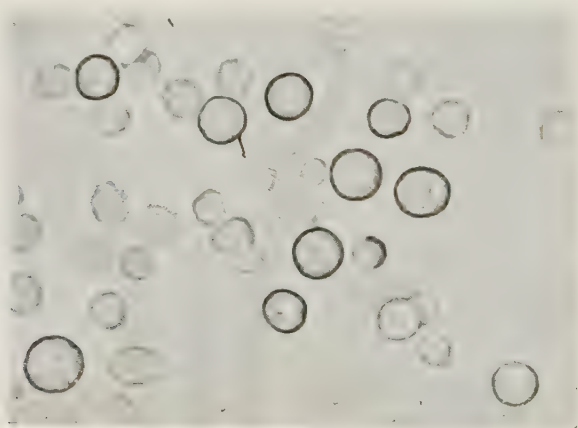


FIG. 58. Microphotographie en lumière ordinaire de mastocytes vivants cultivés depuis 3 jours dans un milieu à base de sérum qui avait été maintenu préalablement pendant 3 jours à 37 °C (Agr. $\times 550$).

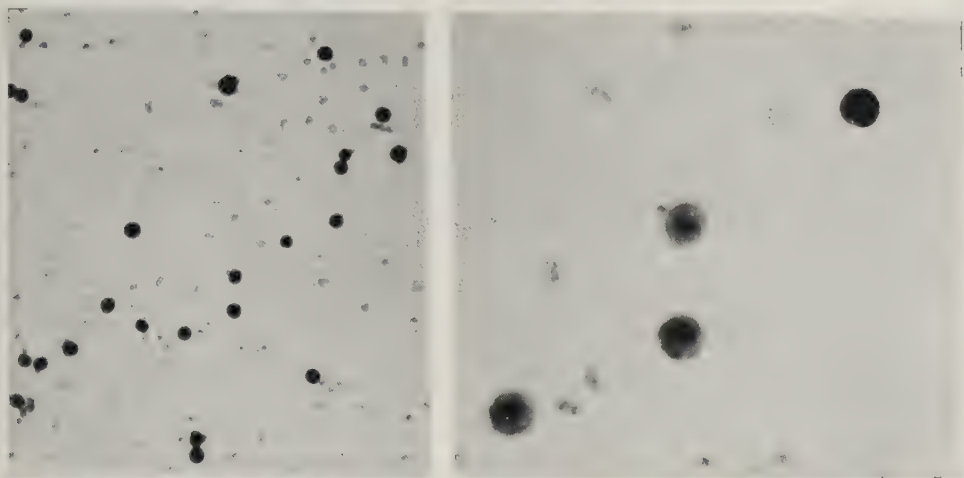


FIG. 59 et 60. Cellules péritonéales cultivées dans un milieu à base de sérum maintenu préalablement 3 jours à 37 °C. Fixation après 72 heures et coloration au bleu alcian-kernechtrot.

FIG. 59, à gauche, vue à faible grossissement (Agr. $\times 150$).

FIG. 60, à droite, vue à plus fort grossissement (Agr. $\times 460$).

Si, au contraire, le milieu liquide est retiré des flacons et remplacé, en totalité ou en partie, par du milieu frais de même composition («entretien»), le nombre des mastocytes encore présents dans les cultures diminue fortement peu après cette manipulation, pour se stabiliser après 24 heures mais à un niveau nettement inférieur. Quand le milieu liquide est renouvelé régulièrement tous les 2 ou 3 jours, on observe encore des mastocytes d'aspect normal après 10 et même 15 jours de culture; toutefois ils sont rares et leur nombre varie fortement d'un flacon à l'autre. Nous insistons cependant sur le fait suivant : si les entretiens sont indispensables à la survie des mastocytes, jamais nous n'avons constaté d'amélioration radicale conduisant à une vraie culture de mastocytes en multiplication active, et cela quelles que soient les conditions dans lesquelles, jusqu'ici, nous ayons procédé à ces entretiens.

Ainsi, nous avons mis au point une technique qui nous permet de faire survivre *in vitro* des mastocytes qui restent en bon état pendant près de 2 semaines.

C. — RECHERCHES EN VUE D'AMÉLIORER
NOS CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons tenté d'améliorer encore la technique dont il vient d'être question. Dans ce but, nous avons recherché, d'une part, l'influence éventuelle de facteurs généraux comme la concentration du milieu en sérum, la fréquence des renouvellements, le nombre de cellules par culture, etc. et, d'autre part, celle de facteurs plus particuliers comme l'enrichissement du milieu en ions sulfate ou l'addition de fibrinogène ou de diverses autres substances au liquide de culture. Ces essais ont nécessité plus de 2 500 cultures.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la plus ou moins grande richesse du milieu de culture en *sérum* ou en *extrait embryonnaire*.

Nous avons réalisé différents milieux dont la concentration en sérum a varié de 2 à 100 %, le complément éventuel étant représenté soit uniquement par du NCTC 109 soit par du NCTC 109 dilué par du liquide F de Puck. Dans certains cas, nous avons incorporé à ces milieux de l'extrait embryonnaire de poulet à raison de 0,5 %, 2 %, 5 %, 10 % ou 20 % du volume total du milieu.

Les concentrations de sérum les plus aptes à assurer la survie des mastocytes sont comprises entre 30 % et 75 % sans que, dans ces limites, on puisse préciser un pourcentage optimum. Quant à l'extrait embryonnaire, son incorporation au milieu n'a guère été bénéfique. Utilisé à assez forte concentration (20 %), il nous a même paru raccourcir sensiblement la survie *in vitro* des mastocytes : celle-ci alors n'a en effet pas dépassé 48 heures.

Une modification de la proportion de sérum dans le milieu ou l'addition d'extrait embryonnaire n'ont pas amené d'amélioration.

Nous avons étudié ensuite l'influence du *nombre total de cellules* par flacon et de la *quantité de milieu liquide*.

Dans les essais réalisés jusqu'à présent, le *nombre de cellules* (population mixte de mastocytes et d'autres cellules) que nous avons habituellement mises en culture était généralement considérable : 4 à 5 millions par flacon de Carrel (D 3,5) (dans 2 ml de milieu liquide). Si le nombre de cellules par flacon est plus élevé, la survie des mastocytes n'est pas écourtée; elle l'est au contraire si ce nombre est inférieur à 4 millions. En ce qui concerne la quantité de milieu liquide, nous l'avons fait varier entre 0,5 et 4 ml par flacon de Carrel.

Ces deux facteurs n'influencent pas la survie des mastocytes.

Par ailleurs, il n'est pas possible d'améliorer nos conditions de culture en modifiant le *pH* du milieu liquide et les *mélanges gazeux* constituant l'atmosphère des flacons.

En modifiant la tension d'anhydride carbonique, nous avons constaté qu'un pH compris entre 7,0 et 7,4 est le plus favorable. Quant à l'augmentation de la tension d'oxygène, elle ne semble avoir aucune influence.

Certaines cultures ont été placées et maintenues à *température subnormale*, à 30 °C. Leur évolution est alors ralentie bien que, en règle générale, elle soit essentiellement comparable à celle des cultures séjournant à 37 °C. La très grande majorité des mastocytes restent alors en bon état pendant 4 à 6 jours et certains d'entre eux survivent encore après 3 semaines. Quant aux températures comprises entre 37 °C et 42° C, elles écourtent simplement la survie.

Nous nous sommes également demandé si *la teneur du milieu en grosses molécules* aurait une influence. Nous avons élevé la pression colloïdo-osmotique du liquide de culture en y incorporant du dextran ou du polyvinylpyrrolidone.

A des milieux renfermant dans tous les cas 20 % de NCTC 109 mais contenant 10, 20, 30 ou 50 % de sérum de veau maintenu préalablement 3 jours à 37 °C ou sans sérum, nous avons ajouté des solutions soit de dextran (poids moléculaire moyen : 75 000; concentration : 18 g pour 100 ml), soit du polyvinylpyrrolidone (poids moléculaire moyen : 40 000; concentration : 10,5 g pour 100 ml). Ces solutions de dextran et de polyvinylpyrrolidone représentaient régulièrement un tiers du volume de la partie non sérique du milieu. En complétant par du liquide de Hanks en quantité variable dans chaque cas, nous avons réalisé une pression colloïdo-osmotique du même ordre de grandeur que celle qui règne dans le plasma sanguin.

La survie des mastocytes obtenue dans ces différentes conditions n'est pas supérieure à celle qu'on peut observer dans des cultures sans dextran ou sans polyvinylpyrrolidone.

Envisageons maintenant l'addition au milieu de différentes substances qui sont en rapport avec la constitution biochimique des mastocytes : d'une part, l'*héparine* et un de ses précurseurs métaboliques, la *glucosamine*; d'autre part, les *amines biogènes* (*histamine* et *5-hydroxytryptamine*) et leurs précurseurs (*histidine* et *5-hydroxytryptophane*).

L'héparine a été utilisée à des concentrations finales variant entre 0,01 mg et 2 mg par ml. Dans aucun cas, elle ne paraît exercer d'influence favorable sur la survie des mastocytes. L'addition de glucosamine reste également sans effet, quelle que soit la quantité ajoutée au milieu (concentrations finales de 0,05 mg et 0,2 mg par ml).

En ce qui concerne les amines biogènes, le milieu de culture a été additionné, selon les cas, soit d'histamine (0,1 à 100 μ g par ml), soit d'histidine (0,1 à 0,5 mg par ml), soit de 5-hydroxytryptamine (0,1 à 50 μ g par ml), soit encore de 5-hydroxytryptophane (0,1 à 0,5 mg par ml). La survie des mastocytes n'a jamais été prolongée. Au contraire, elle nous a paru plutôt écourtée, en particulier après addition d'une quantité considérable d'histamine (100 μ g par ml). Même aux plus fortes concentrations, ces cellules n'ont pas présenté de dégranulation.

Ni l'addition d'héparine ou d'amines biogènes, ni celle de leurs précurseurs métaboliques ne permet de prolonger la survie des mastocytes *in vitro*.

Nous avons aussi ajouté du *fibrinogène* au milieu de culture. Nous avons vu plus haut (p. 141) que des mastocytes mis en présence de plasma hépariné relativement dilué restent morphologiquement intacts pendant un certain temps; une dégranulation n'intervient qu'au moment où le milieu se coagule. Le fibrinogène du plasma se transforme alors en fibrine et disparaît en tant que tel du milieu. Certes, la coagulation sanguine est un processus fort complexe : au cours de ce phénomène, de nombreux constituants du plasma subissent des modifications quantitatives ou qualitatives importantes. Cependant, un des éléments qui différencie essentiellement le plasma du sérum est représenté par le fibrinogène. Cette protéine compterait-elle parmi les facteurs nécessaires à la survie des mastocytes ?

Une autre constatation nous a incité à réaliser des cultures en présence de fibrinogène. Nous savons que des mastocytes « lavés » dégénèrent en moins de 24 heures s'ils sont mis en culture dans la solution nutritive NCTC 109 (voir p. 146). Au cours d'expériences préliminaires, nous avons vu que si, à ce milieu, on ajoute du fibrinogène, préparé par la Nutritional Biochemicals Co (Fibrinogène bovin — Fraction I) aux concentrations finales de 0,01, 0,05, 0,1 ou 0,5 mg par ml, plus de 90 % des mastocytes semblent encore en bon état après 24 heures ⁽¹⁾. La survie la plus longue a été obtenue avec la concentration la plus faible (0,01 mg

⁽¹⁾ Dans les mêmes conditions, des mucopolysaccharides (héparine, acide chondroïtine-sulfurique, acide hyaluronique) ainsi que du collagène (extrait de la queue de rat) se sont avérés incapables de prolonger au-delà de 24 heures la survie des mastocytes « lavés ».

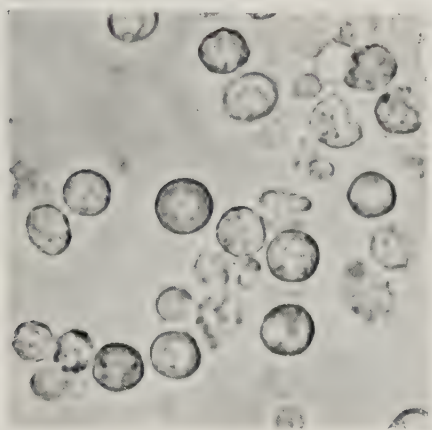


FIG. 61. *Survie des mastocytes « lavés » en présence de fibrinogène (0,01 mg par ml).* Des cellules péritonéales ont été centrifugées et remises en suspension dans une solution saline, deux fois consécutivement. Elles ont été ensuite mises en culture dans du NCTC 109 additionné de fibrinogène. Comme on peut s'en rendre compte sur cette microphotographie en lumière ordinaire, les mastocytes ont conservé leur morphologie normale après 48 heures de vie *in vitro* (Agr. $\times 550$).

par ml). Malgré l'absence de protéines autres que le fibrinogène, la plupart des mastocytes survivent alors 48 à 72 heures (fig. 61). Des résultats analogues à ceux rapportés ici ont été obtenus avec du fibrinogène préparé soit par Roche S. A. soit par Cutter Laboratories (Berkeley) ⁽¹⁾.

Des cellules péritonéales ont été mises en culture selon la technique recommandée à la p. 153 et avec des milieux à base de fibrinogène. Ces derniers ont été préparés de deux façons : d'une part en utilisant du plasma sanguin, généralement d'origine humaine, hépariné à la concentration de 0,5 mg par ml, d'autre part en ajoutant à nos solutions une préparation de fibrinogène isolé à partir de sang bovin.

1) Dans le *premier cas*, le milieu liquide ne contient pas de sérum mais du plasma fortement hépariné représentant, en volume, 1,6 % à 33,3 % du milieu. Des mastocytes peuvent être ainsi maintenus en vie pendant des temps relativement longs, tout au moins lorsque le plasma est très dilué (voir tableau VIII). Les mastocytes survivent alors pendant des durées comparables à celles qu'on obtient dans les conditions de culture que nous avons préconisées à la p. 153. Si nous analysons plus en détails les résultats de l'expérience n° 1 par exemple (voir tableau IX),

⁽¹⁾ Ces échantillons nous ont été fournis par le Professeur J. SALMON que nous remercions vivement.

nous pouvons même constater que, quand la concentration en plasma n'excède pas 1,6 %, la très grande majorité des mastocytes sont encore en bon état après 6 jours.

2) Dans le *second cas*, le milieu a été constitué de 50 % de sérum préalablement maintenu à 37 °C pendant 3 jours et de 50 % de NCTC 109; nous y avons ajouté du fibrinogène d'origine bovine aux concentrations finales de 0,01, 0,1 ou 0,5 mg par ml. D'autres cultures provenant des mêmes prélèvements n'ont pas reçu de fibrinogène et nous ont servi de contrôle.

TABLEAU VIII. Survie maximum de mastocytes cultivés dans un milieu constitué de solution de NCTC 109 et de plasma humain hépariné.
(en jours)

N° de l'expérience	Pourcentage en plasma hépariné du milieu de culture					
	33,3 %	16,6 %	8,3 %	4,9 %	3,3 %	1,6 %
1	4 j	5 j	8 j	11 j	12 j	13 j
2	4 j	5 j	5 j	7 j	7 j	8 j
3	4 j	4 j	4 j	6 j	7 j	7 j

A la concentration de 0,01 mg par ml, le fibrinogène ne nous a pas paru influencer l'évolution des cultures : la survie maximum des mastocytes est de 8 à 11 jours, que ce soit dans les cultures témoins ou les cultures traitées. Le milieu de ces dernières ne semble pas se « gélifier ».

Lorsque la teneur en fibrinogène est plus élevée, les mastocytes restent vivants moins longtemps. A la concentration de 0,1 mg par ml, les mastocytes s'étalent au cours des premiers jours de culture; leur taille ne paraît pas se réduire mais ils semblent moins sombres qu'habituellement. Ils seront rapidement phagocytés. Après 5 jours, tous ont disparu. A ce moment, on distingue souvent, au fond du flacon de Carrel, une pellicule blanchâtre généralement adhérente au verre. Ce dépôt, immergé dans un milieu qui reste liquide, s'opacifie au fur et à mesure que la culture se prolonge. Il peut parfois se détacher à l'occasion d'un entretien et flotter dans le milieu liquide : il ressemble alors beaucoup au « voile » que nous avons décrit précédemment.

Si le milieu est additionné de fibrinogène à raison de 0,5 mg par ml, la survie des mastocytes n'excède pas 3 à 4 jours. Les aspects morphologiques de leur dégénérescence sont comparables à ceux que nous venons de décrire pour une concentration en fibrinogène de 0,1 mg par ml. Ici cependant, le milieu se gélifie entièrement après 16 heures de culture à 37 °C.

TABLEAU IX. Evolution du nombre de mastocytes cultivés *in vitro* dans des milieux constitués, en proportions variées, de solution de NCTC 109 et de plasma humain hépariné.

Durée de la survie (en jours)	Pourcentage en plasma hépariné du milieu de culture					
	33,3 % cult. n° 2509	16,6 % cult. n° 2510	8,3 % cult. n° 2511	4,9 % cult. n° 2512	3,3 % cult. n° 2513	1,6 % cult. n° 2514
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
2	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	++	++	++++	++++	++++	++++
4	+	++	++++	++++	++++	++++
5	0	+	++++	++++	++++	++++
6		0	++	++++	++++	++++
7			+	+++	++++	++++
8			+	+++	+++	+++
9			0	+++	+++	+++
10				++	++	++
11				+	+	+
12				0	+	+
13					0	+
14						0

++++ = plus de 30 mastocytes par champ microscopique de 0,19 mm².

+++ = de 30 à 5 mastocytes par champ microscopique de 0,19 mm².

++ = de 5 à 1 mastocyte par champ microscopique de 0,19 mm².

+ = moins de 1 mastocyte par champ microscopique de 0,19 mm².

0 = aucun mastocyte n'est repérable dans la culture.

En bref, que ce soit dans un milieu à base de plasma ou à base de sérum, le fibrinogène est incapable d'assurer aux mastocytes une durée de vie *in vitro* supérieure à celle obtenue dans des milieux qui en sont dépourvus. Dans de nombreux cas, la survie de ces cellules est, au contraire, abrégée.

Nous avons également recherché si l'enrichissement du milieu en ions sulfate peut prolonger la vie *in vitro* des mastocytes.

Nous avons utilisé des milieux constitués de 50 % de sérum (frais ou préalablement maintenu à 37 °C pendant 3 jours), de 5 %, 10 % ou 20 % de solution « S » et de solution nutritive NCTC 109 pour le reste. Des cultures-contrôle sans solution « S » ont été effectuées pour chacun des prélèvements.

Selon les conditions, les ions sulfate ont un effet favorable, défavorable ou nul.

Pendant les premiers jours de la culture, aucune différence n'est perceptible entre les cultures-contrôle et les autres, quelle que soit la concentration du milieu en sulfate. Si on prolonge la culture sans remplacement du milieu liquide, la présence d'ions sulfate en grande quantité paraît cependant avoir un effet favorable. A titre d'exemple, signalons qu'après 6 jours de culture, 51 % des mastocytes mis en culture avec du sérum frais sont encore en bon état lorsque le milieu a été additionné de solution « S » à raison de 10 %. En l'absence de solution « S », il n'en reste que 29 %.

Cependant, lorsqu'on renouvelle le milieu après un certain délai (généralement 3 à 4 jours) et avec des solutions enrichies en ions sulfate, le nombre des mastocytes semble diminuer plus rapidement encore que dans les cultures-contrôle.

Rappelons enfin que, lorsque le milieu a été enrichi en ions sulfate, le sérum frais ne provoque aucune dégranulation des mastocytes et peut donc être utilisé pour nos cultures; quelles que soient les autres conditions, l'emploi de sérum frais à la place de sérum préalablement maintenu à 37 °C pendant 3 jours n'améliore pas les résultats.

Enfin, nous avons recherché l'influence éventuelle de la *phyto-hémagglutinine* sur nos cultures.

On sait que l'incorporation au milieu de culture de phytohémagglutinine ou de stimulants immunologiques spécifiques entraîne des modifications morphologiques et métaboliques de certaines cellules sanguines, en particulier de petits lymphocytes. Ces cellules deviennent alors capables de se multiplier activement.

Nos tentatives de culture de cellules péritonéales en présence de phytohémagglutinine (à la concentration recommandée pour les cultures de cellules sanguines) ne nous a pas permis d'améliorer les résultats.

* * *

A la suite des données recueillies au cours de ces différentes expériences, nous avons adopté les modalités techniques suivantes pour nos recherches ultérieures. Les cellules péritonéales seront prélevées à l'aide d'une solution saline, en l'occurrence du liquide G de Puck. La suspension cellulaire sera répartie dans 4 flacons de Carrel, abandonnés ensuite pendant une demi-heure à température ordinaire. Le liquide surnageant sera retiré à la pipette et remplacé par 2 ml d'un milieu constitué de 50 % de solution nutritive NCTC 109 et de 50 % de sérum qui a séjourné pendant 3 jours à 37 °C. Le milieu liquide sera renouvelé tous les 3 ou 4 jours.

4. — QUELQUES OBSERVATIONS PORTANT SUR DES MASTOCYTES CULTIVÉS *IN VITRO*

En employant la technique de culture des mastocytes *in vitro* que nous venons de décrire, nous avons pu faire un certain nombre d'observations. Celles-ci ont trait à l'étude de la morphologie, de la cytochimie et de la cytophysiologie de ces cellules. Dans la plupart des cas, nous avons utilisé des cultures âgées de 3 à 4 jours, avant le premier renouvellement de milieu, alors que la majorité des mastocytes mis en culture survivent encore en bon état.

A. — MORPHOLOGIE ET CYTOCHIMIE DES MASTOCYTES PÉRITONÉAUX CULTIVÉS *in vitro*

L'observation en lumière ordinaire de mastocytes cultivés *in vitro* ne révèle aucune modification de l'aspect qu'ils présentent au cours d'examens extemporanés et que nous avons décrit plus haut. Dans nos cultures, les mastocytes sont facilement identifiés grâce à leur forme générale arrondie, leur cytoplasme sombre et leur contour se présentant comme un liséré noir. Une zone centrale apparaît plus claire; elle correspond au noyau. La taille de ces cellules ne se modifie pas sensiblement. Bref, la très grande majorité des mastocytes cultivés selon notre procédé semblent se maintenir en bon état, tout au moins pendant les 3 premiers jours.

Du *rouge neutre* en solution dans du liquide de Ringer a été ajouté à des cultures dont certaines étaient âgées d'une semaine et plus. A la concentration finale de 1/10 000 dans le milieu, les granules mastocytaires prennent très rapidement et fortement ce colorant, on peut ainsi les identifier très facilement. Les vacuoles cytoplasmiques des cellules histiocytaires, en particulier des macrophages, se colorent aussi mais beaucoup plus lentement et moins intensément. En culture, les granules mastocytaires ont donc conservé la capacité de se colorer par cette substance.

Du *point de vue cytochimique*, nous avons procédé à différents essais. La mise en évidence des *mucopolysaccharides* a été réalisée par les différentes réactions et colorations électives que nous avons déjà utilisées au cours des recherches rapportées au

chapitre I : le bleu de toluidine, le bleu alcian et la fuchsine-paraldéhyde.

En vue de procéder à ces examens, des lamelles ont été introduites dans des flacons T. Après un certain délai de culture, généralement 3 à 4 jours, ces lamelles ont été retirées et fixées à l'alcool éthylique à 80 vol. %. Les colorations ont été effectuées de la même manière que pour l'étude des mastocytes de tissus ou liquides directement prélevés sur l'organisme.

Tous les mastocytes que l'examen direct permet d'identifier se colorent par l'une et par l'autre de ces colorations électives. La méthylation préalable des préparations supprime leur colorabilité. L'hyaluronidase testiculaire, par contre, n'affecte pas leurs propriétés tinctoriales. Bref, les caractéristiques cytochimiques des mucopolysaccharides mastocytaires ne semblent pas se modifier en cours de culture. Par ailleurs, grâce à l'emploi du réactif de Schiff, nous avons encore pu démontrer la présence de *groupements aléhydriques libres* dans le cytoplasme de mastocytes ayant séjourné 4 jours en culture. En ce qui concerne les *amines biogènes*, quelques lamelles ont été traitées par les vapeurs de formol-paraldéhyde à 80°C. Observés en lumière ultra-violette, les mastocytes en bon état présentent encore une fluorescence jaune-vert qui, d'après FALK (1962), serait due à la présence

TABLEAU X. Dosages biologiques d'histamine dans des cultures de cellules péritonéales.

N° de la culture	Nombre moyen de mastocytes		Pourcentage de mastocytes ayant survécu après 5 jours de culture	Quantité d'histamine (en µg) après 5 jours de culture	
	A la mise en culture	Après 5 jours		Histamine intracellulaire (dans les mastocytes)	Histamine extracellulaire (dans le surnageant)
2351	50,6	37,3	62 %	4,2 (5,25)	0,36 (0)
2352	29,6	24,6	83 %	4,2 (5,0)	0,24 (0)
2353	34,0	14,1	44 %	2,1 (4,5)	0,42 (0)

Entre parenthèses, les quantités d'histamine présentes dans des prélèvements-contrôle provenant des mêmes animaux et qui n'ont pas été mis en culture.

de 5-hydroxytryptamine. Nous avons par ailleurs pu confirmer la persistance d'une certaine quantité d'histamine dans les mastocytes cultivés *in vitro* (tableau X). On peut estimer que les mastocytes qui ont survécu en culture et sont encore en bon état ont conservé leur charge en histamine. La présence de celle-ci dans le surnageant témoigne cependant de la dégénérescence d'un certain nombre de mastocytes. Cette dégénérescence est d'ailleurs mise en évidence par les dénombrements que nous avons faits en début et en fin d'expérience. Là où la disparition des mastocytes est la plus importante, nous trouvons la plus faible quantité d'histamine intracellulaire et la plus forte concentration en cette amine dans le surnageant.

En conclusion, l'étude cytologique et cytochimique des mastocytes en culture suggère que le séjour *in vitro* de ces cellules n'altère aucun de leurs caractères essentiels.

B. CYTOPHYSIOLOGIE

a) PHAGOCYTOSE ET ATHROCYTOSE.

Dans nos cultures de cellules péritonéales, nous avons fréquemment observé que les cellules histiocytaires phagocytent des globules rouges, des débris cellulaires ou des micro-organismes lors d'infections accidentelles. Les mastocytes ne semblent pas doués de ce pouvoir : alors que, par exemple, des cellules qui les entourent sont bourrées de bactéries, ils n'en renferment pas une seule; même dans les préparations fixées, nous n'avons pu retrouver dans leur cytoplasme aucun des débris qui auraient été phagocytés.

Par ailleurs, les mastocytes en culture n'athrocytent ni l'encre de Chine ni le bleu trypan (fig. 62).

b) MOUVEMENTS, MOTILITÉ.

Au cours des examens directs des mastocytes en culture, nous avons recherché leurs mouvements éventuels. Dans aucun cas, nous n'avons observé de déplacement actif de ces cellules. De plus, lorsqu'elles sont en bon état, elles sont arrondies et leur forme générale ne se modifie pas. Elles sont cependant

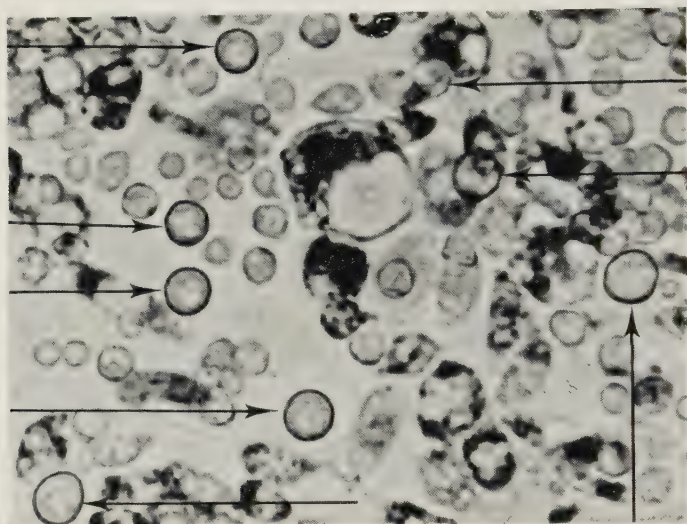


FIG. 62. Mise en évidence de la capacité d'athrocyter l'encre de Chine. Culture de 4 jours photographiée vivante en lumière ordinaire. Les mastocytes indiqués par des flèches n'athrocytent pas l'encre de Chine, contrairement aux cellules histiocytaïres qui, comme on peut le voir ici, accumulent ce colloïde dans leur cytoplasme (Agr. $\times 550$).

parfois légèrement déformées, mais passivement, par les cellules voisines.

Il arrive que la nappe cellulaire se trouvant dans un dépôt gélifié sur le fond du flacon se rétracte, emportant les mastocytes à une certaine distance. Ce déplacement est évidemment passif (voir aussi plus haut).

C. — RECHERCHE D'UNE NÉOFORMATION ÉVENTUELLE DE MASTOCYTES

Nous nous sommes demandé si, en dépit de la dégénérescence progressive des mastocytes, on ne pourrait pas déceler, dans nos cultures, l'apparition de nouveaux éléments de ce type. Deux processus peuvent conduire à cette néoformation : la division de mastocytes préexistants et la transformation en mastocyte d'autres cellules de la culture.

Dans les cultures vivantes, nous n'avons jamais observé de mastocytes en mitose. Sur préparations fixées et colorées au bleu alcian-kernechtrot, nous n'avons pu mettre en évidence

ni des divisions de mastocytes ⁽¹⁾ ni des transformations d'autres cellules en mastocytes. Cependant, certains macrophages possèdent dans leur cytoplasme du matériel mucopolysaccharidique; ce matériel se présente sous forme d'enclaves de tailles très variées et est dispersé irrégulièrement dans le cytoplasme. Il s'agit vraisemblablement de débris mastocytaires qui ont été phagocytés par ces cellules. Ces phagocytes, qui ne sauraient être confondus avec des mastocytes, peuvent se diviser.

D. — TRAITEMENT DES MASTOCYTES
PAR UN AMINO-LIBÉRATEUR : LE 48/80

Les mastocytes soumis à l'action du 48/80 réagissent-ils encore par une dégranulation après un séjour prolongé *in vitro*? Le problème nous paraît intéressant car, si le 48/80 est encore actif dans ces conditions, l'intégrité biologique et fonctionnelle de ces cellules sera plus évidente encore.

Des cultures d'âges différents (de 3 à 8 jours) ont été soumises à l'action du 48/80 à la concentration de 10 μ g par ml. Certaines d'entre elles ont été fixées et colorées par le bleu de toluidine.

A cette concentration, le 48/80 produit un éclatement électif de tous les mastocytes encore en vie dans les cultures. A l'examen direct, les lésions sont morphologiquement identiques à celles que l'on peut observer sur des mastocytes explantés depuis peu (voir p. 91). Ces cellules conservent donc, même après un séjour *in vitro* de plus d'une semaine, la propriété de réagir au 48/80 par un phénomène de dégranulation. Nos observations sur préparations fixées confirment ces résultats. En outre, nous avons pu y voir des histiocytes et des macrophages qui avaient phagocyté des débris mastocytaires, débris facilement reconnaissables par leur métachromasie. Au niveau des cellules histocytaires examinées vivantes, nous n'avons noté aucune expulsion de ce matériel (métachromatique, dans les préparations fixées) sous l'influence du 48/80. Cet amino-libérateur ne semble provoquer aucune lésion morphologiquement décelable au niveau

(1) Dans une série de 8 cultures, nous avons ajouté au milieu 4 heures avant la fixation, de la colchicine à la concentration de 1/25 000 000. Aucun mastocyte en mitose n'a été décelé.

des phagocytes. Le phénomène de décharge de matériel métachromatique dans le milieu extra-cellulaire est donc propre aux mastocytes.

Ajoutons que nous avons également fait agir du 48/80 à la concentration de 10 μ g par ml sur une culture de 3 jours dont le milieu avait été additionné, dès le début, d'héparine à la concentration de 0,1 mg par ml. Dans ces conditions, le cytoplasme de la très grande majorité des cellules autres que les mastocytes se charge de ce mucopolysaccharide et présente une coloration métachromatique après traitement au bleu de toluidine. Si on compare cette culture avec d'autres qui ont reçu de l'héparine mais qui n'ont pas été soumises à l'action du 48/80, on constate que ce dernier est incapable de faire sortir l'héparine accumulée par des cellules qui ne sont pas des mastocytes et de réduire ainsi leur charge en substances chromotropes. L'intérêt de cette observation apparaîtra dans la discussion de ce chapitre.

DISCUSSION DU CHAPITRE III

Avant les nôtres, les essais de culture de mastocytes normaux ont été peu nombreux. A notre connaissance, seul BURTON a décrit, en 1959 et 1960, le sort de ces cellules *in vitro*. Ses résultats peuvent se résumer ainsi : dans les explants de tissu sous-cutané de rat, les mastocytes survivent à peine 4 jours; quant aux mastocytes péritonéaux, ils sont tous dégénérés après 24 heures. On peut donc dire que les tentatives de cet auteur pour cultiver des mastocytes se sont soldées par un échec. Il n'y a rien de surprenant à cet insuccès : BURTON a en effet utilisé des techniques et des milieux de culture habituels sans se préoccuper des exigences particulières de ces cellules.

Pour notre part, dès nos premières expériences, nous avons eu notre attention attirée sur deux aspects importants de la biologie des mastocytes. Premièrement, ces cellules exigent pour leur survie la présence d'une ou de plusieurs substances qui se trouvent dans leur « environnement naturel », par exemple dans le liquide péritonéal. Deuxièmement, le sérum frais provoque la dégranulation des mastocytes.

Nous avons surmonté ces difficultés d'une part en recourant à une méthode permettant de conserver dans le flacon de culture une certaine quantité de substances d'origine péritonéale,

d'autre part en utilisant du sérum qui avait préalablement séjourné pendant 3 jours à 37 °C.

Nous avons ainsi maintenu en vie *in vitro* des mastocytes normaux, d'origine péritonéale, pendant des temps relativement longs. La plupart des mastocytes mis en culture sont encore présents après 3 jours et leur aspect est normal; de plus, il est fréquent d'en observer, en nombre réduit il est vrai, dans des cultures âgées de 10 et même de 15 jours. Ces résultats ont été obtenus après de nombreux essais dont nous n'avons rapporté ici que les plus significatifs. Actuellement, notre technique de culture est *la seule* qui soit capable d'assurer la survie de mastocytes normaux d'origine péritonéale pendant des temps relativement longs.

Dans ces cultures, on peut identifier les mastocytes pendant toute leur survie et en suivre l'évolution. Ils sont aisément reconnaissables, leur aspect ne se modifie pas *in vitro*; ils ne se transforment pas en cellules d'autres types; on ne peut déceler aucun processus de « mastocytogenèse ». En outre, les diverses propriétés et caractéristiques biologiques (action du 48/80 et du sérum, coloration supravitale, absence de phagocytose et d'athrocytose, charge en histamine, etc.) que nous avons mises en évidence à l'aide de suspensions de cellules péritonéales utilisées immédiatement après le prélèvement sur l'animal, se retrouvent chez les mastocytes que nous avons cultivés pendant plusieurs jours. Bref, ces cellules conservent *in vitro* une morphologie, une cytochimie et une cytophysiologie proches de celles qu'elles possèdent dans l'organisme vivant. A partir de ces données et en poursuivant ces recherches, on pourra étudier le mode de fonctionnement des mastocytes. On peut notamment se demander s'il existe à leur niveau une sécrétion faible mais permanente d'héparine, d'histamine ou de 5-hydroxytryptamine en dehors de la libération brutale de ces substances lors du phénomène de dégranulation. Dans l'état actuel de nos connaissances, aucune réponse nette ne peut encore être fournie à cette question. Remarquons cependant que dans l'élaboration d'une conception concernant le mode de fonctionnement, certaines constatations importantes que nous avons faites au cours de notre travail pourraient être très suggestives et nous guider dans nos recherches ultérieures. C'est ainsi que nous avons vu que, lorsque le milieu est à base de plasma sanguin et que l'on pro-

voque la coagulation, les mastocytes se dégranulent; on peut dès lors se demander si une sécrétion de l'héparine présente dans les mastocytes interviendrait normalement pour maintenir la fluidité des milieux dans l'environnement de ces cellules. C'est une des nombreuses voies de recherches dans lesquelles, ultérieurement, nous pourrions nous engager.

* * *

Remarquons que certains auteurs ont envisagé la culture des mastocytes dans une autre perspective. Ils n'ont pas tenté de cultiver des mastocytes bien différenciés, tels qu'on peut les trouver dans l'organisme, mais ont essayé d'obtenir, *in vitro*, une transformation en mastocytes de cellules de divers types. Au chapitre I, nous avons déjà fait toutes nos réserves sur l'existence d'une telle transformation. Au cours de nos recherches *in vitro*, en aucun cas nous n'avons pu démontrer la réalité d'un tel processus. Il n'empêche que la possibilité d'une « mastocytogenèse » normale, *in vivo*, chez des individus adultes, a été défendue par plusieurs Ecoles.

Pour BENSLEY (1952) ainsi que pour BENSLEY et BURTON (1958), la fonction des mastocytes serait d'accumuler des polysaccharides particuliers pour les libérer plus ou moins brutalement dans certaines circonstances. Certaines cellules et notamment des cellules histiocytaïres pourraient, selon eux, se transformer en mastocytes. ASBOE-HANSEN (1954) pensent que des processus comparables pourraient avoir lieu lors des remaniements de la substance fondamentale conjonctive. Par ailleurs, en 1956, HIGGINBOTHAM et DOUGHERTY notèrent que, chez la souris, l'injection intraveineuse d'héparine suivie d'une injection sous-cutanée de 48/80 détermine, à l'endroit de cette dernière, l'apparition de cellules possédant de nombreux granules métachromatiques. Ces cellules ressemblent morphologiquement à des mastocytes, d'où leur appellation de « quasi-mast cells » (WALTON, 1954). Ce processus d'accumulation simultanée de mucopolysaccharides acides et de substances basiques dans certaines cellules suggère à HIGGINBOTHAM (1963) que l'origine des mastocytes doit être recherchée dans une « micellophagocytose » de polysaccharides naturels. Ce processus interviendrait notamment dans la désintoxication de tissus où certaines substances basiques sont présentes (amines, polypeptides ou protéines) (HIGGINBOTHAM, 1958; CARTER, HIGGINBOTHAM et DOUGHERTY, 1959).

L'implication logique commune à ces diverses conceptions est que certaines cellules se transformeraient normalement en mastocytes.

Certains auteurs, en particulier BURTON (1963), ont tenté de reproduire ces phénomènes *in vitro* en faisant absorber par des cellules conjonctives en culture différents polysaccharides (héparine, complexe d'héparine et d'histamine, dextran, imféron, carboxyméthylcellulose). Certaines cellules prennent avidement ces substances et les accumulent dans leur cytoplasme sous forme de grains. Finalement, les cellules s'arrondissent et ressemblent à des mastocytes. Pour cet auteur, les « vrais » mastocytes qu'on peut observer chez l'animal vivant ne diffèreraient de ceux qu'il a obtenus *in vitro* que par la nature de leurs polysaccharides. En effet, il tient pour acquis qu'une « mastocytogenèse » a lieu normalement chez l'individu adulte. Comme nous l'avons rappelé plus haut, nous ne partageons pas les vues de cet auteur car aucune observation faite au cours de nos expériences ne nous incline à penser que certaines cellules pourraient se transformer en mastocytes. Nous estimons que BURTON a provoqué la formation, *in vitro*, de « quasi-mast cells » analogues à ceux que HIGGINBOTHAM (1963) avait obtenus chez l'animal vivant. Aucun argument ne nous permet d'assimiler ces cellules à des mastocytes. Au contraire, nos recherches suggèrent qu'il s'agit d'histiocytes ou de macrophages qui ont absorbé et accumulé des substances métachromatiques mais qui se différencient nettement des mastocytes. C'est ainsi que, au cours de nos recherches *in vitro*, nous avons vu que les cellules qui avaient phagocyté des granules provenant de mastocytes ou accumulé de l'héparine dans leur cytoplasme ne réagissaient pas comme les mastocytes lors de l'addition de 48/80 au milieu : on n'observe pas l'expulsion brutale du matériel métachromatique. Par ailleurs, alors que les mastocytes ne possèdent pas le pouvoir de phagocyter ou d'athrocyter (voir notamment nos observations en culture avec l'encre de Chine ou le bleu trypan), les cellules qui recèlent des débris mastocytaires dans leur cytoplasme sont éventuellement capables non seulement de phagocyter mais également d'athrocyter. En ce qui concerne ces deux dernières propriétés, nos observations sont les seules qu'on possède actuellement à propos des mastocytes *in vitro*.

Chez l'animal vivant, où les conditions d'observation sont loin d'être aussi favorables et l'interprétation aussi facile, nous avons vu que les mastocytes sont aussi incapables de phagocyter et d'athrocyter. C'est d'ailleurs l'opinion de la plupart des auteurs.

Il est regrettable que BURTON n'ait pas tenté de caractériser les cellules qu'il considère comme des mastocytes autrement que d'un point de vue morphologique. Comment réagissent-elles lorsqu'on les met en présence d'un libérateur d'histamine, le 48/80 par exemple ? Possèdent-elles les propriétés biologiques comparables à celles qui sont propres aux mastocytes *in vivo* (coloration supra-vitale par le rouge neutre, absence d'athrocytose et de colloïdopexie, etc.). Avant d'assimiler les cellules qu'il décrit *in vitro* à des mastocytes, BURTON aurait dû effectuer ces contrôles cytophysiologiques. Rappelons que l'histo-chimie n'est d'aucun secours ici car, comme il le montre lui-même, les résultats des réactions histo-chimiques dépendent alors en grande partie de la nature du polysaccharide en cause.

GINSBURG (1963) ainsi que PLUZNİK et SACHS (1966) prétendent aussi avoir obtenu une transformation en mastocytes de cellules de certains types. Ces auteurs ont décrit ce phénomène dans des conditions bien particulières de culture *in vitro* : ils ont en effet utilisé une technique spécialement adaptée à des problèmes de virologie (culture en milieu nutritif à base d'agar-agar), recommandée par WINOCOUR et SACHS (1959, 1960). Dans ces conditions, GINSBURG (1963) a observé que des thymocytes de souris cultivés en présence de cellules embryonnaires de souris peuvent se charger de matériel métachromatique distribué en grains assez fins dans le cytoplasme. Ce phénomène serait plus accusé lorsqu'on inocule aux cultures un virus capable d'engendrer la leucémie chez la souris. Dans ces expériences également, l'identification des mastocytes n'est basée que sur des observations morphologiques rudimentaires. Plus récemment, en cultivant des cellules de rate avec un milieu liquide spécialement conditionné et sur une couche monocellulaire de fibroblastes cultivés eux-mêmes sur agar-agar dans des boîtes de PÉTRI, PLUZNİK et SACHS (1966) ont signalé que la plupart des « cellules spléniques » renferment de nombreux gros grains métachromatiques; ils interprètent leurs expériences en affirmant avoir induit la formation de « clones » de mastocytes grâce à ce milieu spécial. Mais s'ils remplacent l'agar-agar par de la gélatine ou de la méthylcellulose, les cellules ne contiennent plus ces gros granules métachromatiques.

Dans ces expériences, il semble qu'il s'agisse d'une accumulation par des cellules histiocytaires d'un matériel métachro-

matique dérivé de l'agar-agar. Ici aussi, il faut nettement distinguer les véritables mastocytes des cellules histiocytaïres qui ont absorbé des mucopolysaccharides sulfatés. Ce n'est pas parce que des cellules renferment des substances métachromatiques qu'elles possèdent les propriétés biologiques des mastocytes et doivent être identifiées comme telles.

En bref, nous pensons que, jusqu'à présent, aucune « mastocytogenèse » véritable n'a été observée *in vitro*; en tout cas, le fait que les conditions de culture requises pour la survie des mastocytes ne sont pas exigées pour que se produise la néoformation de cellules ressemblant à des mastocytes, incite à une grande prudence dans l'interprétation.

* * *

On sait par ailleurs qu'il est possible de réaliser des cultures de mastocytes tumoraux ou pathologiques. PAFF et ses collaborateurs (1947), PAFF et BLOOM (1949), McDougall (1954) ont cultivé *in vitro* des fragments de mastocytomes apparus chez le chien. ZITCER et KIRK (1953) ont mis en culture un fragment enlevé par biopsie au niveau d'une lésion d'urticaire pigmentaire chez un enfant.

Plus récemment, un mastocytome fut découvert chez la souris par DUNN et POTTER (1957) et un autre par FURTH, HAGEN et HIRSCH (1958). Tous deux étaient aisément transplantables. De l'un d'entre eux, la tumeur P-815 décrite par DUNN et POTTER, il fut possible d'isoler une lignée à partir d'une seule cellule (SCHINDLER et coll., 1959); ces mastocytes tumoraux ont été maintenus *in vitro* pendant des années et leur étude a été poursuivie de manière approfondie (GREEN et DAY, 1960, 1961; MENGEL et TRIER, 1961; VAN ORDEN et coll., 1965; etc.). Ils prolifèrent activement et on peut observer de nombreuses mitoses. En fait, leur culture ne présente aucune difficulté. Ils n'exigent pas des conditions de milieu bien particulières, contrairement aux mastocytes normaux.

Remarquons que si, au moment de l'explantation, on pouvait certes admettre, sur la base de critères morphologiques, que ces cellules tumorales sont de nature mastocytaire, on a cependant observé que, en général, leurs structures se modifient profondément au cours de leur vie *in vitro*. Cela est particulièrement

vrai pour la tumeur mastocytaire de chien étudiée par PAFF et BLOOM ainsi que pour le néoplasme P-815. Dans la première, une certaine vacuolisation du cytoplasme se produit; il existe des granules dépourvus de substance métachromatique. Dans le second, on assiste à une réduction du nombre d'inclusions métachromatiques; celles-ci ne sont cependant jamais absentes (GREEN et DAY, 1960).

On peut s'étonner que les mastocytes tumoraux puissent se cultiver *in vitro* sans difficultés particulières. Il faut toutefois remarquer que ces derniers diffèrent des normaux à plusieurs points de vue. L'aspect cytologique en microscopie optique et surtout l'ultrastructure des mastocytes tumoraux rappellent relativement peu la morphologie des normaux. Chez les premiers, les granules cytoplasmiques sont généralement en petit nombre; leur calibre est variable; ils sont souvent peu denses aux électrons (HAGEN et coll., 1959). Par ailleurs, ces mêmes mastocytes tumoraux sont relativement riches en formations cytoplasmiques telles que les mitochondries, la substance de Golgi, le réticulum endoplasmique, les lysosomes, etc. (GUSEK, 1960; BLOOM, 1963; CHRISTENSEN et coll., 1963) alors que les normaux n'en ont qu'une quantité réduite (SMITH, 1963; FERNANDO et MOVAT, 1963). Notons enfin que BLOOM (1963) a mis en évidence dans les cellules de la tumeur P-815 des formations cytoplasmiques qui rappellent des particules virales.

Du point de vue biochimique, les quantités d'héparine, d'histamine et de 5-hydroxytryptamine présentes dans les mastocytes tumoraux sont de loin inférieures à celles qu'on trouve chez les normaux. Dans les premiers, elles seraient respectivement 20 fois, 260 fois et 9 fois moindres que dans les seconds (GLICK, VON REDLICH et DIAMONT, 1967). Il faut aussi noter que, si les mastocytes normaux ne contiennent que de l'héparine, les mastocytes tumoraux semblent posséder, en plus des polysaccharides du type de l'acide chondroïtine-sulfurique (RINGERTZ, 1963).

Ces constatations font ressortir le danger qu'il y aurait à étendre aux mastocytes normaux des données recueillies à l'aide des mastocytes néoplasmiqes. Il est évident que des cellules dont la morphologie, l'ultrastructure et la constitution biochimique sont tellement différentes, ne peuvent être assimilées les unes aux autres sans aucune précaution, même si

elles possèdent en commun quelques caractères. Les mastocytes tumoraux comme toutes les lignées de cellules tumorales subissent d'ailleurs certaines transformations à la suite desquelles bon nombre des caractères propres aux mastocytes normaux disparaissent ou s'atténuent. Il se pourrait aussi que les exigences particulières des mastocytes normaux en ce qui concerne leur culture *in vitro* n'existent plus chez les tumoraux.

Il est évident que l'étude *in vitro* des mastocytes aura d'autant plus de valeur que ces cellules seront plus proches, par leurs diverses caractéristiques, des mastocytes qu'on trouve normalement dans l'organisme. Nos cultures de mastocytes péritonéaux nous donnent à ce sujet toutes garanties.

RÉSUMÉ DU CHAPITRE III

Nous avons tenté de maintenir en vie *in vitro* et de cultiver des mastocytes normaux de rat. Deux sortes de cultures ont retenu notre attention : d'une part, les explants de mésentère en tubes roulants et d'autre part, les cultures de cellules péritonéales en milieu liquide; dans l'un comme dans l'autre cas, le matériel explanté est relativement riche en mastocytes.

Nous avons montré qu'à l'intérieur d'explants de mésentère, les mastocytes peuvent survivre pendant près de 3 semaines bien qu'ils ne s'y multiplient pas et que leur nombre diminue progressivement.

Avec les cultures de cellules péritonéales, nous avons effectué de très nombreuses expériences; ces cultures conviennent, en effet, particulièrement bien pour rechercher les conditions requises par les mastocytes pour leur survie *in vitro*.

Nos recherches ont tout d'abord établi le fait suivant : en quelques minutes déjà, la coagulation du plasma sanguin déclenche rapidement la dégranulation des mastocytes.

Nous avons aussi noté qu'un grand nombre d'échantillons de sérum frais sont doués d'une activité capable de provoquer des lésions au niveau des mastocytes. On peut abolir cette activité en maintenant le sérum pendant une semaine à la température du laboratoire ou pendant 2 à 3 jours à 37 °C ou encore pendant 30 minutes à 56 °C.

Par ailleurs, nous avons démontré que, pour être maintenues en vie, ces cellules exigent la présence d'une ou de plusieurs substances qui, probablement modifiées mais encore actives, peuvent se « déposer » sur le fond du flacon.

En tenant compte de ces deux derniers faits, nous avons mis au point une technique de culture qui permet de maintenir la plupart des mastocytes en bon état pendant 3 jours dans des cultures de cellules péritonéales; certaines peuvent même y survivre plus de 15 jours.

Nous avons cherché à améliorer notre technique en faisant varier diverses conditions générales de culture : pourcentage de sérum, addition d'extrait embryonnaire, nombre de cellules, etc. En outre, nous avons tenté de préciser les exigences des mastocytes en ajoutant au milieu différentes substances : des mucopolysaccharides, des amines biogènes, du fibrinogène, etc. Au cours de cette étude, nous n'avons pu mettre en évidence aucun facteur ni aucune substance capable d'influencer favorablement et nettement la survie des mastocytes cultivés selon la technique que nous avons mise au point.

Enfin, nous rapportons quelques recherches faites sur les mastocytes cultivés *in vitro*. Ces cellules conservent les caractères tant morphologiques que cytochimiques ou cytophysiologiques que nous avons précédemment mis en évidence au cours de notre étude sur des tissus ou suspensions directement prélevés sur l'animal. Nous n'avons notamment relevé aucun signe permettant d'envisager une éventuelle transformation de mastocytes en cellules d'un autre type ni, inversement, de cellules d'un certain type en mastocytes.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Nous ne reviendrons pas ici sur les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail : ils sont résumés à la fin de chaque chapitre. Nous allons plutôt nous arrêter à quelques considérations d'ordre général qui découlent de nos recherches.

Nous avons dit qu'aucune définition satisfaisante du mastocyte n'avait encore été formulée. Pour notre part, nous avons montré qu'il est impossible, dans l'état actuel de nos connaissances, de caractériser succinctement cette cellule. Toutefois, nous pensons que le mastocyte peut être défini par un ensemble de propriétés cytologiques et biologiques, celles précisément que nous avons relevées au cours de nos observations; nous insistons cependant sur le fait qu'aucun de ces caractères ne leur appartient exclusivement.

Il ne semble pas faire de doute que le mastocyte possède son individualité. En outre, aucune de nos observations ne suggère qu'il s'agirait d'un état cellulaire particulier comme, par exemple, l'état histiocytaire que peuvent prendre des cellules de types divers. Au contraire, nos recherches sont en faveur de la théorie qui ferait des mastocytes une lignée de cellules qui se seraient déjà différenciées au cours de la vie embryonnaire.

D'un point de vue très général, quasi théorique, on pourrait en effet envisager une différenciation de certaines cellules en mastocytes dans trois cas : au cours du développement embryonnaire à partir de certaines cellules conjonctives, à l'âge adulte à partir de fibrocytes ou d'histiocytes, par exemple, ou enfin par transformation de leucocytes polynucléaires basophiles. La première de ces possibilités se vérifie, lorsqu'on recherche les mastocytes chez des embryons de rat. On peut les mettre en évidence dès le 15-16^e jour (ARVY, 1957; GAMBLE et STEMPAK, 1961; SCHAUER et EDER, 1962; BAECKELAND, 1967). Chez les embryons, à la fin de la vie intra-utérine, les mastocytes sont bien reconnaissables quoique leurs granules cytoplasmiques

soient peu nombreux (BATES, 1935). Ce n'est qu'au cours du premier mois après la naissance que leur charge en granules cytoplasmiques se complètera et deviendra comparable à celle que l'on trouve chez des individus adultes. Notons que, chez l'embryon, les mitoses de mastocytes sont fréquentes (BAECKELAND, 1967). Cette différenciation des mastocytes est complètement terminée chez les rats de 2 mois.

Deuxième possibilité, certains affirment qu'il y aurait transformation de fibrocytes, de thymocytes, de lymphocytes ou d'histiocytes en mastocytes, chez des rats adultes (HISSARD et coll., 1951; MONTAGNA, 1953; HUNT et HUNT, 1957; VERGA et PEZZANI, 1959; CSABA, 1960; KLEIN, 1963). Cette hypothèse n'a reçu aucune confirmation par nos recherches. Il serait surprenant qu'un tel phénomène se produisit. Au cours de nos nombreuses observations, nous n'avons décelé aucune forme de transition entre ces types cellulaires et les mastocytes. On imagine difficilement que des mastocytes qui, au cours de leur évolution chez l'embryon, mettent plus d'un mois pour synthétiser leur charge complète en granules, réaliseraient ce travail en un laps de temps tellement court qu'il échapperait à nos recherches. En particulier, une éventuelle origine histiocyttaire a été retenue par différents auteurs (LINDNER, 1961; BIGELOW, 1961; BURTON, 1961). Le fait que les mastocytes ne possèdent aucune capacité d'athrocyter ou de phagocyter, plaide contre une telle théorie. Cependant, les granules mastocytaires prennent le rouge neutre lorsqu'on utilise ce dernier comme colorant vital. Nous pensons que dans ce cas cette coloration n'a pas la même signification que pour les cellules histiocyttaires. Chez ces dernières, c'est uniquement par la cellule vivante que le rouge neutre est concentré dans des vacuoles et fixé sur des grains tandis que, chez les mastocytes, les granules se colorent par le rouge neutre même en solution alcoolique, non seulement quand la cellule est vivante mais aussi quand elle est fixée.

Enfin, troisième possibilité, sur la base de certaines analogies (notamment la présence de granules cytoplasmiques chromotropes), divers auteurs ont rapproché les leucocytes polynucléaires basophiles ⁽¹⁾ des mastocytes tissulaires. Les deux

⁽¹⁾ Le terme « mast leucocytes » est couramment utilisé par les auteurs anglosaxons pour désigner ces cellules.

catégories de cellules n'ont cependant jamais été confondues : l'origine myéloïde des premières a été définitivement établie par MICHELS (1938). Par ailleurs, même dans les tissus, leucocytes basophiles et mastocytes peuvent être aisément distingués les uns des autres grâce à des critères uniquement morphologiques. Notamment REBUCK et ses collaborateurs (1963) l'ont montré au sein de lésions inflammatoires (voir aussi ci-après). En outre, on admet généralement que les basophiles circulants sont absents chez le rat aussi bien que chez la souris; PADAWER (1959) pense cependant qu'ils pourraient exister dans la première espèce mais que leur mise en évidence grâce à leurs propriétés chromotropes vis-à-vis des colorants basiques serait difficile.

Si actuellement personne n'admet plus la transformation de leucocytes basophiles en mastocytes, certains auteurs et notamment RILEY (1959) ont tendance à considérer les premiers comme les mastocytes du sang (« blood mast cells »). Les basophiles possèdent en effet des granules cytoplasmiques métachromatiques au bleu de toluidine et colorables par le rouge neutre. Ils seraient également riches en héparine (LAVES et THOMA, 1950; BEHRENS et TAUBERT, 1952) et en histamine (VALENTINE et coll., 1955; GRAHAM et coll., 1955).

Toutefois, ils se différencient des mastocytes notamment par leur noyau. Chez les basophiles, ce dernier est ovalaire, en fer à cheval ou incisé, ou souvent présente l'aspect de deux masses arrondies accolées, réunies par un court tractus. ACKERMAN (1955) a observé au microscope en contraste de phase, sur le vivant, qu'ils se déplacent lentement. De plus, dans ces mêmes conditions, cet auteur décrit les granules comme ovales, sphériques ou de forme irrégulière; par cellule, ils sont moins nombreux que les granules mastocytaires. ACKERMAN (1963) relève par ailleurs plusieurs caractères cytochimiques qui permettent de distinguer les leucocytes basophiles des mastocytes : on peut mettre en évidence des phospholipides par la méthode de Baker dans les basophiles et ces derniers ne possèdent pas d'hydrolase.

Les mastocytes constituent donc une catégorie de cellules qui non seulement possède son individualité mais qui ne peut être rapprochée d'aucun autre type cellulaire.

Les mastocytes semblent exister chez *tous* les Vertébrés (voir notamment l'importante bibliographie rassemblée à ce sujet par H. SELYE (1965) dans sa monographie « The Mast Cells »).

On peut se demander si les mastocytes ont une fonction qui s'exerce de façon constante ou si, comme le supposent certains auteurs (KELSALL et CRABB, 1959; DOUGHERTY et SCHNEEBELI, 1958; RILEY, 1963), ils n'interviendraient que dans certaines circonstances critiques. Par exemple, RILEY (1963) émet l'hypothèse qu'en cas de besoin, les mastocytes seraient capables de fournir aux autres cellules conjonctives des substances utiles, rapidement assimilables (tréphocytose). Il suppose que cette décharge se produirait à partir des mastocytes en deux vagues successives impliquant des substances différentes. La première correspondrait à une libération d'histamine qui diffuserait rapidement; cette amine activerait les cellules conjonctives environnantes et agirait comme vaso-dilatateur sur les petits vaisseaux du voisinage, favorisant l'afflux de protéines plasmatiques; quant à la seconde vague, il s'agirait d'héparine qui se répandrait plus lentement dans les tissus. En fait, cette théorie en revient à l'ancienne conception d'Ehrlich, qui faisait des mastocytes des cellules-engrais (mastzellen). Quoique séduisante par certains côtés, la théorie de Riley reste fort hypothétique.

Certes, rien ne s'oppose à l'opinion que les mastocytes n'existent dans l'organisme que pour y jouer un rôle dans certaines circonstances exceptionnelles. L'introduction dans l'organisme d'amino-libérateurs chimiques, la réalisation d'un milieu fortement hypotonique, le déclenchement d'une réaction antigène-anticorps en présence de mastocytes sensibilisés constitueraient donc, d'après les auteurs qui défendent la théorie de Riley, autant de situations critiques à l'occasion desquelles les mastocytes libéreraient leurs amines et leur héparine. Remarquons que, dans tous les cas, les lésions provoquées au niveau des mastocytes sont très graves et entraînent souvent la mort de ceux-ci. Dans ces conditions, la phagocytose des débris mastocytaires, par les histiocytes et macrophages, semble être un phénomène banal. Nous l'avons d'ailleurs observée fréquemment, au cours des expériences que nous avons rapportées au chapitre II; nous ne pensons pas qu'il faille donner à ce phénomène une signification particulière. En tout cas, il ne semble pas s'agir de « tréphocytose directe » selon l'expression de Riley.

Cette notion impliquerait, en effet, que chaque fois qu'il y a dégranulation des mastocytes, les cellules qui les accompagnent puissent tirer bénéfice des substances « nutritives » d'origine mastocytaire qui leur seraient ainsi fournies. Nos expériences *in vitro* n'ont en rien confirmé ces vues. Il semble, au contraire, qu'en présence d'un milieu de culture habituel, les cellules péritonéales ne puissent proliférer activement que lorsque les mastocytes ont disparu.

De plus, les histiocytes et les macrophages ne s'emparent pas des granules mastocytaires avec la même rapidité dans tous les cas. L'intensité de la phagocytose semble dépendre de l'état des phagocytes eux-mêmes. En effet, ceux-ci peuvent avoir été ou non lésés, selon la nature des agents amino-libérateurs utilisés. C'est ainsi qu'en présence de polybrène, les cellules péritonéales restent en bon état, à l'exception des mastocytes; c'est dans ce cas que nous avons décrit (au chapitre II) une activité de phagocytose très considérable. Par contre, sous l'action du 48/80, toutes les cellules péritonéales ont tendance à s'arrondir, manifestant ainsi une certaine atteinte; dans ces dernières conditions, les histiocytes et macrophages ne phagocytent les granules mastocytaires qu'après un délai d'une heure ou deux, du moins *in vitro*.

En tout cas, aucune activation manifeste des processus de phagocytose ne se développe sous l'influence des mucopolysaccharides mastocytaires libérés dans le milieu, comme l'avait supposé HIGGINBOTHAM (1956) à la suite de ses expériences chez l'animal traité vivant par des libérateurs d'amines du type du 48/80. L'augmentation de la capacité de phagocytose dans ces dernières conditions doit avoir une tout autre raison. A ce sujet, notre opinion rejoint celle de SCHAYER (1963) qui pense que cette activation dépendrait de l'action de l'histamine sur les vaisseaux; se référant aux travaux de HALPERN (1959), SCHAYER suggère que l'afflux de protéines plasmatiques que la vaso-dilatation provoquée par cette amine entraîne, doit être, dans ces circonstances, le stimulant principal des fonctions histocytaires.

Bref, on ne peut se déclarer convaincu par les arguments que l'on rassemble pour défendre les théories considérant les mastocytes comme des cellules de réserve ne jouant un rôle que dans

certaines circonstances critiques, notamment pour « activer » certains phénomènes réactionnels.

De nombreuses autres hypothèses ont été émises au sujet du rôle des mastocytes dans l'organisme. Comme le disent très bien POLICARD et COLLET (1961) : « Comme à tous les êtres mystérieux, on a eu tendance à lui attribuer des pouvoirs considérables ». Déjà en 1938, MICHELS relevait plus de vingt-cinq théories différentes; beaucoup d'entre elles ne reposent cependant pas sur des bases solides. Parmi les hypothèses les plus récentes, l'une découle cependant d'un travail expérimental considérable. Elle a été émise par SELYE (1966) qui estime que les mastocytes pourraient intervenir dans la fixation du calcium par certains tissus mous. Il a en effet montré qu'il est possible de produire une calcification tissulaire dans différentes circonstances (calciphylaxie, calcergie); de nombreux mastocytes seraient alors dégranulés et certains constituants de leurs granules éjectés fourniraient, d'après cet auteur, la matrice organique indispensable au dépôt de différents cations, en particulier du calcium.

Il serait fastidieux de passer ainsi en revue toutes les théories qui ont été formulées. A notre avis, un des faits qui doit nous guider dans l'étude de la fonction exercée normalement par le mastocyte dans les tissus, c'est avant tout la présence d'une charge considérable en héparine. Au cours de la discussion du chapitre I, nous avons montré que l'existence de ce mucopolysaccharide sulfaté dans le mastocyte constituait un caractère cytochimique beaucoup plus significatif que la présence d'histamine ou de 5-hydroxytryptamine; en effet, si on exclut le cas particulier du sang, il ressort des recherches effectuées jusqu'à présent que l'héparine semble uniquement localisée dans les mastocytes alors que la 5-hydroxytryptamine et l'histamine peuvent se retrouver ailleurs.

Quel pourrait être le rôle de l'héparine mastocytaire ? Les rapports que nous avons mis en évidence entre les mastocytes d'une part et les vaisseaux d'autre part pouvaient plaider en faveur de la participation de ce mucopolysaccharide au maintien de la fluidité des liquides organiques et, notamment, du sang. L'existence d'une sécrétion d'héparine mastocytaire suffisamment abondante pour être efficace au niveau du système circulatoire paraît cependant peu probable même si on

ne peut pas exclure la présence normale de ce mucopolysaccharide à très faible concentration dans le sang. Il est en tout cas troublant de constater que la destruction d'un grand nombre de mastocytes ne rend pas le sang incoagulable, si ce n'est dans le cas particulier du choc peptonique chez le chien (WILANDER, 1938; BAECKELAND et LECOMTE, 1953). Nous pensons cependant que les mastocytes pourraient intervenir *localement* dans le maintien de la fluidité des milieux intratissulaires; dans la discussion du chapitre I, nous avons déjà développé des arguments qui plaident en faveur de cette dernière hypothèse. En d'autres termes, on peut se demander si le rôle des mastocytes ne serait pas de s'opposer à la formation de fibrine à partir du fibrinogène qui pourrait éventuellement se répandre au-dehors des vaisseaux ? Il s'agirait ici de la fonction normalement et constamment dévolue aux mastocytes. Dans des circonstances critiques où le milieu se « gélifie » brusquement, lorsqu'il y a hémorragie intratissulaire, par exemple, il est possible qu'on assiste à l'éclatement, à la dégranulation rapide des mastocytes; c'est en tout cas ce qui se passe *in vitro* lorsqu'on place des mastocytes péritonéaux dans du milieu constitué pour une part importante de plasma sanguin et qu'on déclenche la coagulation de ce dernier. Dans ce dernier cas, on devrait alors interpréter la dégranulation des mastocytes comme une ultime réaction pour tenter de s'opposer à la « gélification » du milieu.

On peut également s'interroger sur le rôle joué par les amines biogènes renfermées par les mastocytes. Il semble que, dans ce domaine, l'interprétation des résultats doit être très prudente. Tout d'abord, la nature des amines biogènes paraît différente d'une espèce animale à l'autre. La 5-hydroxytryptamine ne se retrouve que dans un petit nombre d'espèces animales, notamment chez le rat, la souris et l'homme. Quant à l'histamine qui est généralement présente chez les Mammifères, elle serait absente dans les mastocytes des animaux à sang froid. REITE (1963) a en effet dosé l'histamine dans un certain nombre de tissus contenant de nombreux mastocytes et provenant de Poissons, d'Amphibiens, de Reptiles. La teneur de ces tissus en cette amine est extrêmement faible et du même ordre de grandeur que celle du sang humain. Une libération d'amines biogènes à partir des mastocytes pourra donc avoir des conséquences différentes selon l'espèce animale considérée. En ce qui concerne

les mastocytes de rat, l'histamine comme la 5-hydroxytryptamine libérée pourrait notamment modifier la circulation dans les capillaires ainsi que la perméabilité de leur paroi (WEST, 1958; KELSALL et CRABB, 1959).

Quant au mode de libération *normal* des amines biogènes, il n'a pas encore été exactement précisé jusqu'à présent. Nous avons vu plus haut que de nombreux auteurs, par exemple RILEY (1963), sont d'avis que le passage de ces substances hors des mastocytes n'a lieu que dans des circonstances critiques; on n'a cependant jamais rapporté de fait expérimental s'opposant nettement à l'opinion que les mastocytes seraient à l'origine d'une sécrétion faible mais permanente d'amines biogènes.

D'après nos propres observations, la libération d'amines peut se produire à partir de mastocytes qui présentent des lésions d'aspect et de gravité différents. Primo, l'histamine et la 5-hydroxytryptamine peuvent être libérées lors de la dégranulation mastocytaire provoquée, par exemple par des amino-libérateurs du type 48/80. Dans ce cas, les mastocytes sont profondément lésés et ne semblent pas capables de survivre à cette agression. Secundo, une perte d'amines peut être notée sans nettes modifications morphologiques des mastocytes, en particulier lorsque ces cellules sont placées dans un milieu contenant 10 % de sérum frais (voir p. 115). SMITH (1958) a même observé que, si on utilise comme amino-libérateur du bleu de toluidine ou de la protamine à petites doses répétées, on peut libérer la plus grande partie de l'histamine mastocytaire sans altérer la morphologie de ces cellules. Tertio, nous avons montré qu'en culture, les mastocytes libéraient de l'histamine dans le milieu lorsqu'ils dégénéraient et mouraient.

On peut se demander si, lorsque des mastocytes perdent une partie de leurs amines biogènes sans présenter de modifications morphologiques correspondant à une lésion cellulaire grave — comme leur dégranulation ou leur dégénérescence en culture — ils n'exerceraient pas la fonction qui leur est normalement dévolue dans l'organisme; la dégranulation observée, par exemple sous l'influence du sérum frais utilisé à concentration supérieure à 10 %, pourrait n'être alors que l'exagération d'un phénomène normal. Dans l'état actuel des recherches, on ne peut pas encore se prononcer sur la validité de telles hypothèses.

Par contre, nos recherches permettent d'affirmer que, lorsque la cellule meurt ou va mourir, une libération d'amines biogènes a lieu, quel que soit l'agent en cause et qu'il y ait dégranulation ou non. Cette conclusion générale fait ressortir, une fois de plus, le bien-fondé de l'hypothèse que nous avons émise au chapitre II, à savoir que ces amines ne peuvent être maintenues *in situ*, dans les mastocytes, que si les métabolismes généraux et particuliers de ces cellules sont assurés. Il se pourrait donc que la perte d'histamine subie par les mastocytes dont l'aspect morphologique n'est pas modifié relève aussi de lésions peut-être moins brutales que lors d'une dégranulation mais pourtant suffisamment graves pour perturber profondément leurs métabolismes et, éventuellement, entraîner leur mort à plus longue échéance.

Bien que la plupart des auteurs hésitent à se prononcer sur la signification exacte de cette décharge d'histamine sans lésions morphologiquement décelables, ils ont tendance à considérer ce phénomène comme une altération des mastocytes plutôt que comme une sécrétion normale de ces cellules. Ils trouvent notamment un argument de poids dans les résultats des travaux de BLOOM et HAEGERMARK (1965). Ces derniers ont, en effet, noté qu'après traitement par de faibles doses de 48/80, les mastocytes libèrent une partie de leur histamine sans présenter de lésions décelables en microscopie optique; au microscope électronique, les granules cytoplasmiques seraient cependant anormalement modifiés dans leur ultrastructure. Les mastocytes ainsi traités présenteraient donc des « lésions » et non des modifications fonctionnelles. Pour notre part, nous pensons que le problème ne peut pas être résolu actuellement et que ce point ne sera élucidé que si on étudie, en culture *in vitro*, la viabilité de ces mastocytes et si on fait la preuve de leur intégrité biologique. Nous nous proposons d'entreprendre pareilles recherches dans un avenir proche.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Notre contribution à la connaissance des mastocytes du rat a comporté l'étude de leur cytologie et de leur distribution chez cet animal, l'analyse de leur comportement sous l'influence de différentes substances, notamment des amino-libérateurs, ainsi que la mise au point de techniques pour assurer leur survie *in vitro*. Ce travail nous a permis de découvrir ou de préciser diverses particularités du mastocyte. Cette cellule ne se caractérise pas uniquement par la présence de granules constitués de substances chromotropes mais par tout un ensemble de propriétés cytologiques et biologiques.

Dans la première partie de notre mémoire, nous avons étudié la morphologie, la cytophysiologie, la cytochimie et la distribution des mastocytes.

1. Du point de vue morphologique, les mastocytes ont été examinés ou vivants ou après fixation. Dans le premier cas, nos observations ont été faites surtout au niveau de mastocytes péritonéaux, à fort grossissement en lumière ordinaire, en contraste de phase ou en contraste interférentiel selon NOMARSKI. Nous avons décrit l'aspect normal de ces cellules dans les différentes conditions optiques; nous avons montré que certaines images observées à leur niveau, comme les vacuoles, correspondent non pas à une manifestation de leur activité normale mais bien à une lésion. Dans le second cas, ce sont aussi bien des préparations de cellules péritonéales que des coupes faites dans de nombreux tissus qui nous ont servi à préciser la morphologie normale du mastocyte après fixation.

2. La cytophysiologie des mastocytes a également retenu notre attention. Ces cellules ne sont pas de nature histiocyttaire, comme l'ont prétendu certains auteurs; elles ne phagocytent pas, n'athrocytent pas et ne sont pas mobiles dans les conditions normales ou le sont peu. Des recherches à l'aide des techniques

cytophotométrie en lumière visible et histoautoradiographique à base de thymidine tritiée nous ont montré que les mastocytes constituent une population extrêmement stable se renouvelant très peu.

3. Une étude cytochimique nous a permis de constater que, chez le rat, les mastocytes se caractérisent tous par la présence constante et simultanée dans leur cytoplasme de mucopolysaccharides, d'amines et de substances à groupements aldéhydiques libres. La nature de ces différents constituants semble être la même dans tous les mastocytes, quelle que soit leur localisation.

4. En ce qui concerne leur distribution, nous avons noté la présence habituelle de mastocytes dans le tissu conjonctif lâche; assez fréquemment, on les observe à proximité des petits vaisseaux sanguins. Nous avons par ailleurs établi que les mastocytes se rencontrent parfois dans certains tissus épithéliaux de revêtement.

Dans la deuxième partie, nous rapportons nos observations (de courte durée : au maximum deux heures) sur des mastocytes prélevés dans le péritoine et traités *in vitro* et extemporanément par des substances capables de libérer certaines amines ou, tout au moins, de diminuer leur concentration dans les tissus. Ces agents peuvent léser les mastocytes avec plus ou moins de spécificité. Nous avons particulièrement étudié dans le cadre de notre travail le 48/80, le 1935 L, le polybrène, l'eau distillée, le sérum. Tous doivent être considérés comme des amino-libérateurs car, comme nous l'avons montré par des recherches cytochimiques et des dosages biologiques, ils libèrent à la fois l'histamine et la 5-hydroxytryptamine présentes dans les granules. Cependant, les lésions provoquées au niveau des mastocytes sont fort différentes d'un cas à l'autre; en d'autres termes, il n'existe pas d'image caractéristique de la libération des amines à partir de ces cellules. Quant aux dextrans, qui libèrent de l'histamine et altèrent les mastocytes *in vivo*, ils sont sans effets sur des mastocytes maintenus en survie dans des solutions salines.

En outre, nous avons démontré que la réserpine, si elle est capable de réduire fortement la teneur en 5-hydroxytryptamine de certains tissus, ne détermine aucune atteinte morphologiquement décelable des mastocytes et ne libère par leur 5-hydroxytryptamine, tout au moins dans des délais courts. La réserpine

ne peut donc être considérée comme un amino-libérateur dans le sens défini par LECOMTE (1966).

Dans la troisième partie, nous avons tenté de résoudre le problème de maintenir des mastocytes en vie *in vitro*. Aucune technique applicable aux mastocytes normaux n'ayant encore été mise au point auparavant, nous nous sommes efforcé de rechercher les conditions qui doivent être nécessairement réalisées pour assurer leur survie *in vitro*. Nous avons cultivé d'une part des tissus riches en mastocytes (mésentère), d'autres par des suspensions de cellules qui existent, libres, dans le liquide péritonéal et parmi lesquelles les mastocytes sont relativement nombreux. Dans le premier cas, nous avons retrouvé des mastocytes encore en bon état après 3 semaines de culture. Dans le cas de la culture de cellules péritonéales, nous avons montré que les mastocytes exigent, pour être maintenus en vie plus de 24 heures, la présence d'un ou de plusieurs facteurs qui existent dans le liquide de prélèvement. Ce ou ces facteurs seraient présents dans le dépôt qui se forme au fond des flacons de culture lorsqu'on transfère dans ces derniers une suspension cellulaire obtenue par lavage de la cavité abdominale et qu'on la laisse reposer.

Nos recherches ont aussi établi le point suivant : en quelques minutes déjà, la coagulation du plasma sanguin déclenche la dégranulation des mastocytes. Cette dégranulation s'accompagne de la libération de certains de leurs constituants. Ces altérations sont irréversibles. Il est donc difficile de cultiver des mastocytes péritonéaux dans un milieu à base de plasma qui va se coaguler.

Une dégranulation serait aussi provoquée par certaines substances que l'on retrouve dans un grand nombre d'échantillons de sérum frais : à concentration supérieure à 10 %, ce dernier déclenche aussi la dégranulation de nombreux mastocytes. On peut abolir cette activité en maintenant le sérum pendant une semaine à la température du laboratoire, pendant 2 à 3 jours à 37 °C ou encore pendant 30 minutes à 56 °C.

En tenant compte de ces faits, nous avons mis au point une technique de culture permettant de maintenir la plupart des mastocytes en bon état pendant 3 jours dans des cultures de cellules péritonéales. Certaines de ces cellules y ont même survécu pendant près de 15 jours.

Nous avons poursuivi nos investigations dans ce domaine en tentant de préciser les facteurs requis pour une culture à plus long terme des mastocytes péritonéaux. De très nombreuses substances, notamment des mucopolysaccharides et des amines biogènes, ont été ajoutées au milieu de culture. Aucune de ces substances n'a permis de prolonger la survie des mastocytes *in vitro*.

La mise au point d'une technique de culture des mastocytes normaux ouvre de nombreuses perspectives d'avenir. Nous l'avons montré en rapportant des observations faites grâce à cette technique (étude des capacités d'athrocyter et de phagocyter, des effets des amino-libérateurs, des colorations supravitales, etc.). *In vitro*, les mastocytes conservent les caractéristiques tant morphologiques que cytochimiques ou cytophysiologiques que nous avons précédemment mises en évidence au cours de notre étude sur des tissus ou suspensions directement prélevés sur l'animal. Par ailleurs, nous n'avons relevé, dans ces conditions, aucun signe permettant d'envisager une éventuelle transformation de mastocytes en cellules d'un autre type ni, inversement, de cellules d'un autre type en mastocytes.

* * *

De l'ensemble de ce travail, il ressort que les mastocytes possèdent une individualité qui les différencie nettement des autres types cellulaires. Nous proposons de définir les mastocytes comme des cellules *sui generis*, pas ou peu mobiles dans les conditions habituelles, ne possédant pas de propriétés histiocytaires et caractérisées morphologiquement par la présence dans le cytoplasme de granules très abondants dont l'un des constituants majeurs est l'héparine; dans les grains se trouvent aussi des amines qui, chez le rat, ont été identifiées comme de l'histamine et de la 5-hydroxytryptamine.

En outre, nos recherches suggèrent que la fonction normale des mastocytes dans l'organisme serait liée au maintien de la fluidité du milieu intérieur, notamment aux endroits où circule de la lymphe interstitielle. Leur disséminement dans l'organisme serait particulièrement bien adapté à cette fonction qui, par ailleurs, peut s'exercer quelle que soit la nature du tissu, épithélial

ou conjonctif, dans lequel les mastocytes se trouvent. Ils ne peuvent être considérés en tout cas comme des éléments localisés uniquement dans le tissu conjonctif. En cas de rupture vasculaire et d'hémorragie intra-tissulaire, nous pensons que les mastocytes pourraient réagir par une dégranulation brutale et libérer certains de leurs constituants. En effet, nous avons vu que, *in vitro*, ces cellules se dégranulent lorsqu'elles se trouvent dans un milieu à base de plasma sanguin et que ce dernier se coagule. En outre, les mastocytes pourraient être attirés par chimiotactisme vers les zones tissulaires où du sang s'est coagulé.

De toute façon, le mastocyte ne représente pas un état cellulaire temporaire, transitoire, car nous n'avons jamais observé de signes indiquant que, chez le rat adulte, les mastocytes peuvent prendre l'aspect morphologique propre à d'autres espèces cellulaires ou qu'inversement, d'autres cellules peuvent se transformer en mastocytes. Après leur différenciation pendant la vie embryonnaire, l'augmentation de leur nombre ne semble dépendre que de divisions des mastocytes eux-mêmes.

SUMMARY

Our contribution to the knowledge of normal rat tissue mast cells first consists of attempts to determine more precisely the morphology, the cytophysiology, the cytochemistry and the distribution of these cells. Furthermore, the effects of various substances upon peritoneal mast cells, particularly amino-releasers, were studied. We also investigated conditions to maintain mast cells alive *in vitro*.

Mast cell cytology. Living peritoneal mast cells were observed at high magnification with ordinary light, phase-contrast and interference microscope. Normal aspect of these cells is described and some alterations studied. Morphology of mast cells after fixation and staining are also discussed. From a cytophysiological point of view, it was investigated whether mast cells, as histiocytes and macrophages, were capable of phagocytosis, athrocytosis and motility; under normal conditions, they were not. The cytophotometrical and histoautoradiographical results support the idea that mast cell mitosis may occur but not very frequently. The cytochemical investigations suggest that the polysaccharide and amine content of normal mast cells does not vary from one localization to another. In all the mast cells, the presence of substances with free aldehydic groups was also demonstrated. Moreover the mast cells distribution in rat was studied. The cells were principally located in the loose connective tissue, especially around blood vessels but they were also found in a few epithelial tissues, for example in the mucosa of the oesophagus.

In vitro treatment of the peritoneal mast cells by amino-releasers and reserpine. The effects of 48/80, 1935 L, polybrene, dextran, distilled water, serum and reserpine on isolated peritoneal mast cells were studied by phase-contrast microscopy, cytochemical methods and biological dosages of histamine. Under these conditions, dextran and reserpine were not capable of damaging mast cells and releasing amines. The other above-mentioned agents caused alterations of mast cells and the release concurrently of histamine and 5-hydroxytryptamine. The mor-

phological changes observed directly in the phase-contrast microscope were not similar in each case; no unique, "typical" pattern of mast cell releasing amines could be recognized.

In vitro mast cell survival. Different tissue and cell culture techniques were used in order to maintain mast cells alive as long as possible. Either mesentery or peritoneal fluid cells were cultivated. Inside the explants of mesentery cultivated in roller-tubes, it was possible to observe morphologically normal mast cells after three weeks cultivation. The peritoneal mast cells were not able to survive for more than 24 hours if the culture medium did not contain any peritoneal fluid. Mast cell alterations often occurred when fresh serum was added to the medium. If such a serum has been previously heated to 56° C for 30 minutes or to 37° C for three days, its mast cell destroying capacity did not persist. According to these results a culture technique is described which permits maintenance of most of the mast cells for three days; a few of them were still living after fifteen days cultivation. Further studies on mast cells *in vitro* were performed to solve problems relevant to the physiology of these cells.

Finally, mast cells are defined as a *sui generis* cell exhibiting only very little or no motility under normal conditions and possessing no phagocytic potency. They are morphologically characterized by cytoplasmic granules containing heparin and staining metachromatically with toluidine blue.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ACKERMAN, G. A. — Cytochemical properties of blood basophilic granulocyte. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 376-393 (1963).
- ACKERMAN, G. A. and N. C. BELLIOS. — A study of the morphology of the living cells of blood and bone marrow in vital films with the phase contrast microscope. I. Normal blood and bone marrow. *Blood*, **10** : 3-16 (1955).
- ALLEN, A. M. — Two methods for coloring mast cells of mammalian tissues. *Amer. J. clin. Path.*, **33** : 461-469 (1960).
- ALLEN, A. M. — Mitosis and binucleation in mast cells of the rat. *J. nat. Cancer Inst.*, **28** : 1 125-1 151 (1962).
- ALLEN, A. M. — in : « Round Table Discussion of the Conference on Mast Cells and Basophils », New York, 1962. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : p. 464 (1963).
- ANGELAKOS, E. T. — The formaldehyde condensation method for the histochemical demonstration for tissue monoamines. *J. Histochem. Cytochem.*, **12** : 929-931 (1964).
- ARCHER, G. T. — Release of histamine from mast cells by tissue extracts. *Nature (London)*, **182** : 726-727 (1958).
- ARCHER, G. T. — The release of histamine from rat mast cells by blood treated with dextran. *Nature (London)*, **184** : 1 151-1 152 (1959).
- ARCHER, G. T. — Release of heparin from the mast cells of the rat. *Nature (London)*, **191** : 90 (1961).
- ARNOLD, J. — Zur Morphologie und Biologie der Mastzellen, Leucocyten und Lymphocyten. *Münch. med. Wschr.*, **53** : 585-589 (1906).
- ARVY, L. — Histogenèse et répartition des labrocytes chez le rat. *C. R. Ass. Anat.* 43^e Réunion, *Lisbonne* : 165-170 (1956).
- ASBOE-HANSEN, G. — Autoradiography of mast cells in experimental skin tumors of mice injected with radioactive sulfur (³⁵S). *Cancer Res.*, **13** : 587-589 (1953).
- ASBOE-HANSEN, G. — The mast cell. *Int. Rev. Cytol.*, **3** : 399-435 (1954).
- ASBOE-HANSEN, G. — in discussion of « Histochemical properties of mucopolysaccharide and basic protein in mast cells » by S. S. SPICER. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 322-333 (1963).
- ASBOE-HANSEN, G. and H. LEVI. — Mitotic division of tissue mast cells as indicated by the uptake of tritiated thymidine. *Acta path. microbiol. scand.*, **56** : 241-244 (1962).
- ASBOE-HANSEN, G. and O. WEGELIUS. — Mast cells and intercellular mucopolysaccharides in Rous fowl sarcoma. *Cancer Res.*, **17** : 792-793 (1957).
- AUSTEN, K. F. and K. J. BLOCH. — Differentiation *in vitro* of antigen-induced histamine release from complement-dependent immune injury. in Ciba Foundation Symposium, Churchill ed., London 1960, *complement* : 281-298.
- BAECKELAND, E. — Influence d'implantats sanguins et fibrineux sur le nombre des mastocytes et tactisme de ces cellules. *C. R. Soc. Biol.*, **154** : 1 005-1 007 (1950a).
- BAECKELAND, E. — Evolution des mastocytes dans la peau du cobaye à la suite d'implantations sanguines et fibrineuses. *C. R. Soc. Biol.*, **154** : 1 007-1 009 (1950b).
- BAECKELAND, E. — Contribution à l'étude *in vivo* des mastocytes. *Ann. Histochem.*, **3** : 179-185 (1958).

- BAECKELAND, E. — Effet du dextran et du polyvinylpyrrolidone sur les mastocytes normaux cultivés *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **158** : 904-907 (1964).
- BAECKELAND, E. — Augmentation du nombre de mastocytes péritonéaux du rat sous l'influence d'héparine injectée par voie intraveineuse. *C. R. Soc. Biol.*, **159** : 2 083-2 085 (1965a).
- BAECKELAND, E. — Culture de mastocytes de rat à une température subnormale (30 °C). *C. R. Ass. Anat.*, 50^e Réunion, Lausanne : 108-114 (1965b).
- BAECKELAND, E. — Etude de la fluorescence des mastocytes normaux de rat fixés aux vapeurs de paraformaldéhyde. *C. R. Soc. Biol.*, **160** : 1 736-1 740 (1966a).
- BAECKELAND, E. — Etude histoautoradiographique des mucopolysaccharides présents dans les granules cytoplasmiques des mastocytes de souris. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **263** : 268-270 (1966b).
- BAECKELAND, E. — Recherches non publiées (1967).
- BAECKELAND, E., M. CHÈVREMONT et S. CHÈVREMONT-COMHAIRE. — Etude des acides désoxyribonucléiques dans des cellules traitées vivantes par du trihydroxy-N-méthylindole. *C. R. Ass. Anat.*, 45^e Réunion, Gand : 135-142 (1958).
- BATES, E. O. — A quantitative study and interpretation of the occurrence of basophil (mast) cells in the subcutaneous tissue of the albino rat. *Anat. Rec.*, **61** : 231-239 (1935).
- BEHRENS, M. und M. TAUBERT. — Der Nachweis von Heparin in den basophilen Leukocyten. *Klin. Wschr.*, **30** : 76-78 (1952).
- BENDITT, E. P. — Morphology, chemistry and function of mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **73** : 204-211 (1958).
- BENDITT, E. P. and M. ARASE. — An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsine. *J. exp. Med.*, **110** : 451-460 (1959).
- BENDITT, E. P., M. ARASE and M. E. ROEPER. — Histamine and heparin in isolated rat mast cells. *J. Histochem. Cytochem.*, **4** : 419-420 (1956).
- BENDITT, E. P., J. HOLCENBERG and D. LAGUNOFF. — The role of serotonin (5-hydroxytryptamine) in mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 179-184 (1963).
- BENDITT, E. P., E. P. WONG, M. ARASE and E. ROEPER. — 5-hydroxytryptamine in mast cells. *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, **90** : 303-304 (1955).
- BENSLEY, S. H. — Histological studies of the reactions of cells and intercellular substances of loose connective tissue to the spreading factor of testicular extracts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **52** : 983-987 (1950).
- BENSLEY, S. H. — On the origin of mast cells. *Anat. Rec.*, **112** : P 310 (1952).
- BENSLEY, S. H. and A. L. BURTON. — The finer structure of developing mast cell. *Anat. Rec.*, **130** : P 280 (1958).
- BERALDO, W. T., W. DIAS da SILVA and A. D. L. FERNANDEZ. — Inhibitory effects of carbohydrates on histamine release and mast cell disruption by dextran. *Brit. J. Pharmacol.*, **19** : 405-413 (1962).
- BHATT, K. G. S., R. JALOTA and R. K. SANYAL. — Action of various drugs on the tissue histamine and 5-hydroxytryptamine contents of common laboratory animals. *Indian J. med. Res.*, **52** : 52-60 (1964).
- BHATTACHARYA, B. K. and G. P. LEWIS. — The release of 5-hydroxytryptamine by histamine liberators. *Brit. J. Pharmacol.*, **11** : 202-208 (1956).
- BIGELOW, E. L. — Changing concepts concerning mastocytosis. *J. Pediat.*, **58** : 499-507 (1961).
- BLENKINSOPP, W. K. — Mast cell proliferation in adult rats. *J. Cell. Sci.*, **2** : 33-37 (1967).
- BLOOM, G. D. — Studies on the cytology, cytochemistry and pathology of mast cell. (Thesis). Karolinska Institutet, Stockholm, Suède (1960).
- BLOOM, G. D. — Electron microscopy of neoplastic mast cells. A study of the mouse mastocytoma mast cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 53-86 (1963).
- BLOOM, G. D. and O. HAEGERMARK. — A study on morphological changes and histamine induced by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells. *Exp. Cell Res.*, **40** : 637-654 (1965).
- BLOOM, M. L. and G. WISLOCKI. — The localization of lipids in human blood and bone marrow cells. *Blood*, **5** : 79-88 (1950).

- BRAUNSTEINER, H., E. MITSOTAKIS and N. THUMB. — Über die Wirkung von Diaminodecan auf Mastzellen und basophile Leukozyten. *Blut*, **3**: 255-257 (1957).
- BRAY, R. E. and A. N. VAN ARDSEL. — *In vitro* histamine release from rat mast cells by chemical and physical agents. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **106** : 255-259 (1961).
- BRIMACOMBE, J. S. and J. M. WEBBER. — Mucopolysaccharides. B. B. A. Library. Elsevier Publ., Amsterdam, 1964. Vol. 6, 181 p.
- BRODIE, B. B. and P. A. SHORE. — A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66** : 631-648 (1957).
- BULMER, D. — Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *St. Techn.*, **34** : 95-98 (1959).
- BUÑO, W. — Algunas reacciones histoquímicas y funcionales de los mastocitos. *Acta physiol. lat. amer.*, **3** : 60-66 (1953).
- BURTON, A. L. — Observations préliminaires sur le sort des mast cells du fluide péritonéal de rat en culture de tissus. *Rev. Canad. Biol.*, **18** : 103-109 (1959).
- BURTON, A. L. — The fate of normal mast cells studied in tissue culture by means of time lapse cinephotomicrography. *Anat. Rec.*, **136** : 407-412 (1960).
- BURTON, A. L. — Studies on living normal mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 243-263 (1963).
- BURTON, A. L. and S. H. BENSLEY. — The finer structure of developing mast cells. *Anat. Rec.*, **130** : P 280 (1958).
- CARTER, P. B., R. D. HIGGINBOTHAM and T. F. DOUGHERTY. — The local response of tissue mast cells to antigen in sensitized mice. *J. Immunol.*, **79** : 259-264 (1957).
- CASS, R., P. B. MARSHALL and J. F. RILEY. — 5-hydroxytryptamine and histamine in mast cells of the mouse and rat. *J. Physiol. (London)*, **141** : 510-519 (1958).
- CHÈVREMONT, M. — Recherches sur l'origine, la distribution, les caractères cytologiques et les propriétés biologiques des histiocytes et des macrophages par la méthode de la culture de tissus. *Arch. Biol.*, **53** : 281-492 (1942).
- CHÈVREMONT, M. — Notions de Cytologie et Histologie. Vol. I et II, Desoer éd., Liège, 1966, 1 210 p.
- CHÈVREMONT, M., S. CHÈVREMONT-COMHAIRE et E. BAECKELAND. — Action de désoxyribonucléases neutre et acide sur des cellules somatiques vivantes cultivées *in vitro*. I^{re} et II^e parties. *Arch. Biol.*, **70** : 811-831 (1959).
- CHÈVREMONT, M. et J. FREDERIC. — Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulphydrique. *Arch. Biol.*, **54** : 589-605 (1943).
- CHRISTENSEN, H. E., O. H. IVERSON and R. RASK-NIELSEN. — Studies on a transplantable mastocytoma in mice. II Electron microscopic observations. *J. nat. Cancer Inst.*, **30** : 763-781 (1963).
- COLEMAN, L. C. — Preparation of leucobasic fuchsin for use in the Feulgen reaction. *St. Techn.*, **13** : 123-124 (1938).
- COMPTON, A. S. — A cytochemical and cytological study of the connective tissue mast cell. *Amer. J. Anat.*, **91** : 301-326 (1952).
- COUPLAND, R. E. — Mast cells and chromaffin cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 139-150 (1963).
- COUPLAND, R. E. and J. F. RILEY. — Mast cells and 5-hydroxytryptamine in precancerous mouse skin. *Nature (London)*, **187** : 1 128-1 129 (1960).
- CRAMER, W. and W. L. SIMPSON. — Mast cells in experimental skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, **4** : 601-616 (1944).
- CRONBERG, S. and I. M. NILSSON. — The effect of induced fibrinolysis and various substances on the mast cells in the peritoneal fluid and mesentery of the rat. *Acta path. microbiol. scand.*, **60** : 156-163 (1964).
- CSABA, G., T. ACS, T. HORVATH and K. MOLD. — Genesis and function of mast cells. Mast cell and plasmocyte reaction to induced, homologous and heterologous tumours. *Brit. J. Cancer*, **15** : 327-335 (1961).
- CSABA, G. and K. MOLD. — Über die Wirkung von Hormonbehandlungen auf die Mastzellenbildung in Thymus der Ratte. *Z. mikr. anat. Forsch.*, **68** : 163-175 (1962).

- CURRAN, R. C. and J. S. KENNEDY. — The distribution of the sulfated mucopolysaccharides in the mouse. *J. Path. Bact.*, **70** : 449-457 (1955).
- DALCO, A. M. et M. de GREEF. — Nouvelles observations sur les granules cytoplasmiques dans l'œuf de rat et de souris. *C. R. Ass. Anal.*, 45^e Réunion, Gand : 329-336 (1958).
- DANON, D., S. GITTER and M. ROSEN. — Deformation of red cell shape induced by *Vipera palestinae* venom *in vivo*. *Nature (London)*, **189** : 320-321 (1961).
- DEVITT, J. E., P. B. SAMUELS, W. PIROZYSKI and D. R. WEBSTER. — Morphology of tissue mast cells : the frequency of artefacts and the influence of certain biologic agents. *Amer. J. Path.*, **30** : 391-401 (1954).
- DIAMANT, B. and B. UVNÄS. — Evidence of energy-requiring processes in histamine release and mast cell degranulation in rat tissue induced by compound 48/80. *Acta physiol. scand.*, **53** : 315-329 (1961).
- DONIACH, I. and S. R. PELC. — Autoradiographic technique. *Brit. J. Radiol.*, **23** : 184-192 (1950).
- DOUGHERTY, T. F. and G. L. SCHNEEBELI. — Microcinematographic demonstration of mast cell desintegration in living isolated loose connective tissue of mice (motion picture). *Fed. Proc.*, **17** : 37 (1958).
- DUNN, T. B. and M. POTTER. — A transplantable mast cell neoplasm in the mouse. *J. nat. Cancer Inst.*, **18** : 587-601 (1957).
- EHRMANN, R. L. and G. GEY. — The growth of cells on transparent gel of reconstituted rat tail collagen. *J. nat. Cancer Inst.*, **16** : 1 375-1 403 (1956).
- EHRlich, P. — Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thèse, Leipzig (1878).
- EHRlich, P. — Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes. *Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt.*, **13** : 571-579 (1879).
- EVANS, V. J., J. C. BRYANT, M. C. FIORAMONTI, W. T. MCQUILKIN, K. K. SANFORD and W. R. EARLE. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. I A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. *Cancer Res.*, **16** : 77-86 (1950).
- EVANS, V. J., J. C. BRYANT, W. T. MCQUILKIN, M. C. FIORAMONTI, K. K. SANFORD, B. B. WESTFALL and W. R. EARLE. — Studies of nutrient media for tissue cells *in vitro*. II An improved protein-free chemically defined medium for long-term cultivation of strain L-929 cells. *Cancer Res.*, **16** : 87-94 (1956).
- FALCK, B. — Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. *Acta physiol. scand.*, **56**, suppl. 197 : 1-25 (1962).
- FALCK, B., N. A. HILLARP, G. THIEME and A. TORP. — Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. *J. Histochem. Cytochem.*, **10** : 354-384 (1962).
- FALCK, B. et C. OWMAN. — A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. *Acta Universitatis Lundensis* — Sectio II, **7** : 1-24 (1965).
- FAWCETT, D. W. — Cytological and pharmacological observations on the release of histamine by mast cells. *J. exp. Med.*, **100** : 217-224 (1954).
- FAWCETT, D. W. — An experimental study of mast cell degranulation and regeneration. *Anal. Rec.*, **121** : 29-52 (1955).
- FEAGLER, J. R. and J. F. A. McMANUS. — Extraction resistance of sudan stained mast cells after previous treatment. *J. Histochem. Cytochem.*, **12** : 530-532 (1964).
- FELDBERG, W. and M. SCHACHTER. — Histamine release from skin by horse serum. *J. Physiol. (London)*, **117** : 3P-4P (1952).
- FELIX, M. D. and A. J. DALTON. — A phase-contrast microscope study of free cells native to the peritoneal fluid of DBA/2 mice. *J. nat. Cancer Inst.*, **16** : 415-446 (1955).
- FERNANDO, N. V. P. and H. Z. MOVAT. — The fine structure of connective tissue. III : The mast cell. *Exp. molec. Path.*, **2** : 450-461 (1963).
- FIGURE-DONATI, L., G. DE BENEDICTIS, L. CHIECOBIANCHI and G. BERTACCINI. — Development of mast cell reaction during chemical skin carcinogenesis of mouse. *Nature (London)*, **193** : 287-288 (1962).

- FIRKET, H. — Un appareil de cytophotométrie en lumière visible. *Ann. Histochem.* **1** : 277-286 (1956).
- FIRKET, H. — Recherches sur la synthèse des ADN et la préparation à la mitose dans des cellules cultivées *in vitro* (Etude cytophotométrique et autoradiographique). *Arch. Biol.*, **69** : 1-166 (1958).
- FISHER, E. R. and R. D. LILLIE. — Effect of methylation on basophilia. *J. Histochem. Cytochem.*, **2** : 81-87 (1954).
- FRIBERG, U., W. GRAF and B. ÅBERG. — On the histochemistry of the mast cells. *Acta pathol. microbiol. scand.*, **29** : 197-202 (1951).
- FURANO, A. V. and J. P. GREEN. — The uptake of biogenic amines by mast cells of the rat. *J. Physiol. (London)*, **170** : 263-271 (1964).
- FURTH, J., P. HAGEN and E. I. HIRSCH. — Transplantable mastocytoma in the mouse containing histamine, heparin and 5-hydroxytryptamine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **95** : 824-828 (1957).
- GABE, M. — Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde. *Bull. Micr. appl.*, **3** : 153-162 (1953).
- GAMBLE, H. J. and J. G. STEMPAK. — Observations upon the mast cells of rat foetal tissues. *Experientia*, **17** : 460-461 (1961).
- GESNER, B. M. and C. R. JENKIN. — Production of heparinase by bacteroides. *J. Bacteriol.*, **81** : 595-604 (1961).
- GINSBURG, H. — The *in vitro* differentiation and culture of normal mast cells from the mouse thymus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 20-39 (1963).
- GLICK, D., D. VON REDLICH and B. DIAMANT. — Heparin, histamine and serotonin in normal and malignant mast cells, and nanogram determination of serotonin. *Biochem. Pharmacol.*, **16** : 553-559 (1967).
- GOMORI, G. — Chloroacetyl esters as histochemical substrates. *J. Histochem. Cytochem.*, **1** : 469-470 (1953).
- GRAHAM, G. S. — The hemic basophil. *J. exp. Med.*, **31** : 209-231 (1920).
- GRAHAM, H. T., F. WHEELWRIGHT, H. H. PARIS, A. R. MARKS and O. H. LOWRY. — Distribution of histamine among blood elements. *Fed. Proc.*, **11** : 350 (1952).
- GREEN, J. P. and M. DAY. — Heparin, 5-Hydroxytryptamine and histamine in neoplastic mast cells. *Biochem. Pharmacol.*, **3** : 190-205 (1960).
- GREEN, J. P. and M. DAY. — Uptake and metabolism of amines by mast cells in culture. *Fed. Proc.*, **20** : 136 (1961).
- GUIDOTTI, G. — Turnover of the sulphate groups in mast cells of young and adult rats. Quantitative autoradiographic study. *Exp. Cell Res.*, **12** : 659-661 (1957).
- GURR, E. — Methods of analytical histology and histo-chemistry. Leonard Hill Ltd, London, 1958, 327 p.
- GUSEK, W. — Zur Ultrastruktur und Genese von Mastzellen und Mastzellengranula, in : Proc. of the Delft Conference on Electron Microscopy, **11**, 912-916 (1960).
- GUSTAFSSON, B. E. and S. CRONBERG. — Comparison of the effects of compound 48/80, protamine, and turpentine oil on mast cell degranulation. *Acta rheum. scand.*, **3** : 189-202 (1957).
- HARDY, W. B. and F. F. WESBROOK. — The wandering cells of the alimentary canal. *J. Physiol. (London)*, **18** : 490-524 (1895).
- HAGEN, P., R. J. BARNETT and F. L. LEE. — Biochemical and electron microscopic study of particles isolated from mastocytoma cells. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **126** : 91-97 (1959).
- HAGEN, P. and F. L. LEE. — Amino acid decarboxylases of mouse mast cells. *J. Physiol. (London)*, **143** : 7 P. (1958).
- HAGIHARA, M. — Phase contrast microscopic and electron microscopic observation of mast cell. *Acta haemat. jap.*, **23** : 747-761 (1960).
- HALPERN, B. N. — The role and function of the reticulo-endothelial system in immunological processes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **11** : 321-338 (1959).
- HIGGINBOTHAM, R. D. — Studies of the functional interrelationship of fibroblasts and ground substances mucopolysaccharides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **73** : 186-203 (1958).
- HIGGINBOTHAM, R. D. — in « Round Table Discussion of the Conference on Mast Cells and Basophils », New York, 1962. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : p. 477 (1963).

- HIGGINBOTHAM, R. D. and T. F. DOUGHERTY. — Mechanism of heparin protection against a histamine releaser (48/80). *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **92** : 493-498 (1956).
- HISSARD, R., L. MONCOURIER, J. JACQUET et A. TREUSSIÉ. — Répartition des basocytes et réactions de l'organisme déclenchées par l'implantation sous-cutanée d'un caillot sanguin. *Rev. Path. gén. comp.*, **646** : 401-423 (1953).
- HÖGBERG, B. and B. UVNÄS. — The mechanism of disruption of mast cells produced by compound 48/80. *Acta physiol. scand.*, **41** : 345-369 (1957).
- HÖGBERG, B. and B. UVNÄS. — Further observations on the disruption of rat mesentery mast cells caused by compound 48/80, antigen-antibody reaction, lecithinase A and decylamine. *Acta physiol. scand.*, **48** : 133-145 (1960).
- HOLMGREN, H. and O. WILANDER. — Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen. *Z. mikr. anat. Forsch.*, **42** : 242-278 (1937).
- HORSFIELD, G. I. — Mast cell mucopolysaccharides. *Nature (London)*, **211** : 422 (1966).
- HUNT, T. E. and E. A. HUNT. — A study of the mast cells in the rat after injections of the histamine-liberator, compound 48/80. *Anat. Rec.*, **124** : 309 (1956).
- JASMIN, G. et P. BOIS. — Coloration différentielle des mastocytes chez le rat. *Rev. canad. Biol.*, **20** : 773-774 (1961).
- JONSSON, G. — Fluorescence methods for the histochemical demonstration of monoamines. *Histochemie*, **8** : 288-296 (1967).
- JORPES, J. E. — Heparin. in : Euler *et al.*, Comparative Endocrinology, II. Part 2. Tissue Hormones. Academic Press, New York, 112 p. (1963).
- JORPES, J. E. and S. GARDELL. — On heparin monosulfuric acid. *J. biol. Chem.*, **176** : 267-276 (1948).
- JORPES, J. E., H. HOLMGREN und O. WILANDER. — Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. *Z. mikr. anat. Forsch.*, **42** : 279-301 (1937).
- JORPES, J. E., E. ODEBLAD and H. BOSTRÖM. — An autoradiographic study on the uptake of ³⁵S labelled sodium sulphate in the mast cells. *Acta haemat. (Basel)*, **9** : 273-276 (1953).
- JORPES, J. E., B. WERNER and B. ÅBERG. — The fuchsin-sulfurous acid test after periodate oxidation of heparin and allied polysaccharides. *J. biol. Chem.*, **176** : 277-282 (1948).
- KACHLER, H. — Zum Mechanismus der Mastzellzerstörung durch bakterielle und tierische Gifte. Inaug.-Diss., Würzburg (1958). Cité par R. KELLER. — Tissue mast cells in immune reactions. Monographs in Allergy edited by P. Kallos, H. C. Goodman and T. Inderbitzin, Karger ed., Bâle, 1966, Vol. 2, 144 p.
- KAHLSON, G., E. ROSENGREN and R. THUNBERG. — Increased rate of histamine formation in anaphylaxis. *J. Physiol. (London)*, **172** : 18P (1964).
- KANTOR, T. G. and M. SCHUBERT. — A method for the desulfation of chondroitin sulfate. *J. amer. chem. Soc.*, **79** : 152-154 (1957).
- KELLER, R. — Histamin und 5-Hydroxytryptamin in den Gewebemastzellen der Albinoratte. *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, **15** : 371-375 (1957a).
- KELLER, R. — Tissue mast cells in anaphylactic shock and anaphylactoid reactions. *Int. Arch. Allergy*, **11** : 328-341 (1957b).
- KELLER, R. — Biochemische Eigenschaften und physiologische Bedeutung der Gewebemastzellen. *Schweiz. med. Wschr.*, **90** : 503-508 (1960).
- KELLER, R. — Effect of antibodies against rat γ -globulin or rat albumin on isolated peritoneal rat mast cells. *Nature (London)*, **193** : 282 (1962).
- KELLER, R. — Voraussetzungen für das Zustandekommen eines zytolysierenden Effektes durch Phosphatidase A. *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, **22** : C76-C78 (1964a).
- KELLER, R. — Unpublished data (1964b) in : « Tissue mast cells in immune reaction » Monographs in Allergy, edited by P. Kallos, H. C. Goodman and T. Inderbitzin, Karger ed., Bâle, 1966, Vol. 2, p. 93.
- KELLER, R. — Zur Bedeutung von Lysolecithin für die Immuncytolyse von Mastzellen. *Path. Microbiol.*, **28** : 185-196 (1965a).
- KELLER, R. — Anaphylaxis in isolated rat mast cells. IV. Studies on the possible role of lysolecithin as an agent responsible for immune cellular injury. *Int. Arch. Allergy*, **28** : 201-216 (1965b).

- KELLER, R. — Tissue mast cells in immune reactions. Monographs in Allergy edited by P. Kallos, H. G. Goodman and T. Inderbitzin, Karger ed., Bâle 1966. Vol. 2, 144 p.
- KELLER, R. und W. BURKARD. — Die Bedeutung der Gewebesmastzellen für die Histaminfreisetzung. *Helv. physiol. pharmacol. Acta*, **14** : 289-298 (1956).
- KELLER, R. und G. C. OPLIGER. — Zum Verhalten menschlicher Gewebesmastzellen *in vitro*. *Klin. Wschr.*, **39** : 1 028-1 029 (1961).
- KELLER, R. und M. SCHWARZ. — Zur Fixation von Antikörpern und isolierte Mastzellen. *Schweiz. med. Wschr.*, **91** : 1 196-1 197 (1961).
- KELLER, R. und M. SCHWARZ. — Versuch zur Charakterisierung der anaphylaktischen Reaktion isolierter Gewebesmastzellen der Albinoratte mittels spezifischer Antisera. *Path. Microbiol.*, **26** : 100-107 (1963).
- KELSALL, M. A. and E. D. CRABB. — Lymphocytes and mast cells. Edited by the Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1959, 399 p.
- KLEIN, R. — Mastocytes thymiques et relations des mécanismes de défense de l'organisme avec la pathogénie des cancers. *C. R. Soc. Biol.*, **157** : 718-720 (1963).
- KOBAYASHI, Y. — Histamine binding by heparin. *Arch. Biochem.*, **96** : 20-27 (1962).
- KOLLER, F. — La conception actuelle de la coagulation du sang. *J. Physiol.*, **53** : 131-144 (1961).
- LAGUNOFF, D. and E. P. BENDITT. — A new method for study *in vitro* of morphologic and chemical changes in mast cells. *J. Histochem. Cytochem.*, **7** : 286 (1959a).
- LAGUNOFF, D. and E. P. BENDITT. — 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in rat mast cells. *Amer. J. Physiol.*, **196** : 933-937 (1959b).
- LAGUNOFF, D. and E. P. BENDITT. — Proteolytic enzymes of mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 185-198 (1963).
- LAGUNOFF, D., R. CALHOUN and E. P. BENDITT. — Direct measurement of radioactive sulfate uptake by rat mast cells. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, **104** : 575-579 (1960).
- LAGUNOFF, D., K. B. LAM, E. ROEPER and E. P. BENDITT. — 5-hydroxytryptamine formation from 5-hydroxytryptophan by mast cell. *Fed. Proc.*, **16** : 363 (1957).
- LAGUNOFF, D., M. T. PHILLIPS, O. A. ISEI and E. P. BENDITT. — Isolation and preliminary characterization of rat mast cell granules. *Lab. Invest.*, **13** : 1 331-1 344 (1964).
- LAGUNOFF, D., M. T. PHILLIPS and E. P. BENDITT. — Histochemical demonstration of histamine. *J. Histochem. Cytochem.*, **8** : 325-327 (1960).
- LAVES, W. und K. THOMA. — Histo-enzymatische Untersuchungen in der Mastzellen des Blutes. *Klin. Wschr.*, **28** : 95 (1950).
- LEBLOND, C. P. and B. MESSIER. — Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine ³H into mice. *Anat. Rec.*, **132** : 247-260 (1958).
- LECOMTE, J. — Sur le mécanisme de l'action hypotensive du dextran chez le rat. *Rev. belge Path.*, **30** : 155-166 (1964).
- LECOMTE, J. — Rôle respectif de l'histamine et de la 5-hydroxytryptamine au cours de l'hypotension artérielle induite chez le rat par le dextran et le 1935 L. *Arch. int. Physiol. Biochem.*, **74** : 877-888 (1966).
- LEV, R. and S. S. SPICER. — Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **12** : 309-310 (1964).
- LILLIE, R. D. — Further exploration of the HIO₄-Schiff reaction with remarks on its significance. *Anat. Rec.*, **108** : 239-253 (1950).
- LILLIE, R. D. — Methylation and alkali demethylation. *J. Histochem. Cytochem.*, **6** : 398-399 (1958).
- LINDNER, D. — Die Mastzellen. *Arch. klin. exp. Dermat.*, **213** : 588-606 (1961).
- LISON, L. — Etude sur la métachromasie. Colorants métachromatiques et substances chromotropes. *Arch. Biol.*, **46** : 599-668 (1935).
- LISON, L. — Histochimie et cytochimie animales, Gauthier-Villars éd., Paris, 1960, 842 p.
- LISON, L., W. A. HADLER et L. SAMPAIO. — Résultats non publiés. in : LISON, L. — Histochimie et cytochimie animales, Gauthier-Villars éd., Paris, 1960, 842 p.
- MARTIN, H. und L. ROKA. — Zur Frage des Heparin-Gehaltes der Blutmastzellen des Menschen. *Acta haemat.*, **10** : 26-31 (1953).

- MCDougALL, J. D. B. — Experimental studies on neoplastic mast cells cultivated *in vitro*. *Verh. anat. Ges. (Jena)*, **52** : 322-329 (1954).
- MCGOVERN, V. J. — Mast cells and their relationship to endothelial surfaces. *J. Path. Bact.*, **71** : 1-6 (1956).
- MCQUILKIN, W. T., V. J. EVANS and W. R. EARLE. — The adaptation of additional lines of clone 929 (strain L.) cells to chemically defined protein-free medium NCTC 109. *J. nat. Cancer Inst.*, **19** : 885-907 (1957).
- MENGEL, C. E. and J. S. TRIER. — Biochemical and morphologic heterogeneity in a transplantable mast cell neoplasm. *J. nat. Cancer Inst.*, **27** : 1 341-1 359 (1961).
- MICHEL, N. A. — The mast cells. In : Downey's Handbook of Hematology. P. B. Hoeber Publ., New York, Vol. 1 : 232-372 (1938).
- MONTAGNA, W., A. Z. EISEN and A. S. GOLMAN. — The tinctorial behaviour of human mast cells. *Quart. J. micr. Sci.*, **95** : 1-4 (1954).
- MONTAGNA, W. and C. R. NOBAK. — Acid phosphatase and lipids in the mast cells of the rat. *Science*, **106** : 19 (1947).
- MORAN, N. C., B. UYNÄS and B. WESTERHOLM. — Release of 5-hydroxytryptamine and histamine from rat mast cells. *Acta physiol. scand.*, **56** : 26-41 (1962).
- MORAN, N. C. and B. WESTERHOLM. — The influence of reserpine on 5-hydroxytryptamine and histamine content of rat mast cells and some rat tissues. *Acta physiol. scand.*, **53** : 20-29 (1963).
- MORRIONE, T. G. — The formation of collagen fibres by the action of heparin on soluble collagen : an electron microscope study. *J. exp. Med.*, **96** : 107-112 (1952).
- MOTA, I. — Recent knowledges on mast cell and basophil physiology. Communication presented to the 3d Meeting of the Brasileira Sociedade de Hematologia e Hemoterapia. Recife, Brasil, 1954.
- MOTA, I. — The behaviour of mast cells in anaphylaxis. *Int. Rev. Cytol.*, **15** : 363-397 (1963a).
- MOTA, I. — Biological characterization of « mast cell sensitizing » antibodies. *Life Sci.*, **1** : 465-474 (1963b).
- MOTA, I. — The mechanism of anaphylaxis. II. The role of « mast cells sensitizing » antibody and delayed hypersensitivity in rat anaphylaxis. *Immunology (London)*, **7** : 700-706 (1964).
- MOTA, I., A. G. FERRI and S. YONEDA. — The distribution of mast cells in the digestive tract of laboratory animals : its bearings on the problem of the location of histamine in tissues. *Quart. J. micr. Sci.*, **97** : 251-256 (1956).
- NAGAYO, M. — Studien über die Gewebsmastzellen. *Centralbl. allg. Path. path. Anat.*, **43** : 289.
- NEPRIAKHIN, G. G. — About basophilic fuchsinophilic granules of nervous tissue and mast cells. In : SELYE, H. The mast cells. Butterworth Publ., London, 1965, p. 47.
- ORLANDI, G. — Osservazioni sulla presenza, sulla distribuzione numerica e sul significato delle Mastzellen nella mucosa nasale. *Arch. ital. Otol.*, **72** : 34-36 (1961).
- PAASONEN, M. K. and M. VOGT. — The effects of drugs on the amount of substance P and 5-hydroxytryptamine in mammalian brain. *J. Physiol. (London)*, **131** : 617-626 (1956).
- PADAWER, J. — Studies on mammalian mast cells. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, Ser II, **19** : 690-713 (1957).
- PADAWER, J. — A stain for mast cells and its application in various vertebrates and in a mastocytoma. *J. Histochem. Cytochem.*, **7** : 352-353 (1959).
- PADAWER, J. — Quantitative studies with mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 87-138 (1963).
- PADAWER, J. — Some studies on the fluorescence of mast cells after paraformaldehyde treatment. *Z. Zellforsch.*, **75** : 178-200 (1966).
- PADAWER, J. and A. S. GORDON. — Cellular elements in the peritoneal fluid of some mammals. *Anat. Rec.*, **124** : 209-222 (1956).
- PAFF, G. M. and F. BLOOM. — Vacuolation and the release of heparin in mast cells cultivated *in vitro*. *Anat. Rec.*, **104** : 45-60 (1949).

- PAFF, G. M., F. BLOOM and C. REILLY. — The morphology and behaviour of neoplastic mast cells cultivated *in vitro*. *J. exp. Med.*, **86** : 117-124 (1947).
- PAFF, G. M. and D. D. MERGENTHALER. — Vacuolation in normal mast cells and in mast cells treated with protamine sulfate. *Anal. Rec.*, **121** : 579-593 (1955).
- PAPPENHEIM, A. — Einige interessante Tatsachen und theoretische Ergebnisse der vergleichenden Leucocytenmorphologie. *Folia haemat. (Leipzig)*, **8** : 504-563 (1909).
- PAREKH, A. C. and D. GLICK. — Studies on histochemistry. LXV. Heparin and hexosamine in isolated mast cells : determination intracellular distribution, and effects of biological state. *J. biol. Chem.*, **237** : 280-286 (1962).
- PARISH, W. E. — The distribution of mast cells and the possible functions of some of their pharmacological agents. In : CHALMERS, A., Biological aspects of occlusive vascular disease. University Press, Cambridge, 1964, p. 84.
- PARRATT, J. R. and G. B. WEST. — Tissue histamine and 5-hydroxytryptamine. *J. Physiol. (London)*, **132** : 40P (1956).
- PARRATT, J. R. and G. B. WEST. — Release of 5-hydroxytryptamine and histamine from tissues of the rat. *J. Physiol. (London)*, **137** : 179-192 (1957).
- PAUL, J. — Cell and tissue culture. Livingstone Ltd, Edinburgh, 1959, 261 p.
- PAYSA, A. N. and E. D. KORN. — The degradation of heparin by bacterial enzymes. I. Adaptation and lyophilized cells. *J. biol. Chem.*, **223** : 853-859 (1956).
- PLUZNIK, R. M. and L. SACHS. — The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exp. Cell Res.*, **43** : 553-563 (1966).
- POLICARD, A. et A. COLLET. — Recherches par microcinématographie en contraste de phase sur le comportement des mastocytes péritonéaux à l'état vivant. *Bull. Micr. appl.*, **9** : 81-87 (1959).
- POLICARD, A. et A. COLLET. — Physiologie du tissu conjonctif. Masson et Cie éd., Paris, 1961, 258 p.
- POLICARD, A., A. COLLET et S. PREGERMAIN. — Etude au microscope électronique des mastocytes des tissus chez les Mammifères. *Rev. Hématol.*, **15** : 374-384 (1960).
- PUCK, T. T., S. J. CIECIURA and A. ROBINSON. — Long term cultivation of employed cells from human and animal subjects. *J. exp. Med.*, **108** : 945-946 (1958).
- PULVERTAFT, R. J. V. et J. G. HUMBLE. — Culture de moelle osseuse sur lames tournantes. *Rev. Hématol.*, **11** : 349-377 (1956).
- QUENSEL, U. — Studien über die Gewebsmastzellen. *Acta pathol. microbiol. scand.*, suppl. 16 : 358-375 (1933).
- RASKOVIC, D. — Etude cytochimique des lipides des granulocytes à l'état normal, après irradiation et dans les leucémies. *C. R. Soc. Biol.*, **155** : 2 455-2 457 (1961).
- REBUCK, J. W., J. M. HODSON, R. J. PRIEST and C. L. BARTH. — Basophilic granulocytes in inflammatory tissues of man. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 409-426 (1963).
- REILLY, E. B., J. SHINTANI and J. R. GOODMAN. — Systemic mast cell disease with urticaria pigmentosa. *Arch. Derm. Syph. (Chicago)*, **71** : 561-569 (1955).
- REITE, O. B. — A phylogenetical approach to the functional significance of tissue mast cell histamine. *Nature (London)*, **206** : 1 334 (1965).
- RILEY, J. F. — The relationship of the tissue mast cells to the blood vessels in the rat. *J. Path. Bact.*, **65** : 461-469 (1953a).
- RILEY, J. F. — Histamine in tissue mast cells. *Science*, **118** : 332-333 (1953b).
- RILEY, J. F. — The riddle of the mast cells. A tribute to Paul Ehrlich., *Lancet*, **1** : 841-844 (1954).
- RILEY, J. F. — Fluorescent mast cells in precancerous mouse skin. *Experientia*, **14** : 141 (1958).
- RILEY, J. F. — The mast cells. Livingstone Ltd, Edinburgh, 1959, 182 p.
- RILEY, J. F. — Functional significance of histamine and heparin in tissue mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 151-161 (1963).
- RILEY, J. F. and G. B. WEST. — The presence of histamine in tissue mast cells. *J. Physiol. (London)*, **120** : 528-537 (1953).
- RINGERTZ, N. R. — Polysaccharides of neoplastic mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 209-224 (1963).
- ROGERS, G. E. — Electron microscopy of mast cells in the skin of young mice. *Exp. Cell Res.*, **11** : 393-402 (1956).

- ROTH, E., H. NOLTENIUS und W. OEHLERT. — Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Neubildung und zum Sulfateinbau in Gewebsmastzellen. *Frankf. Z. Path.*, **73** : 40-51 (1963).
- ROTHSCHILD, A. M. and R. W. SCHAYER. — Characterization of histidine decarboxylase from rat peritoneal fluid mast cells. *Biochem. biophys. Acta*, **34** : 392-398 (1959).
- ROWLEY, D. A. and E. P. BENDITT. — 5-hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. *J. exp. Med.*, **103** : 399-412 (1956).
- SAEKI, K. — Effects of compound 48/80, chymotrypsin and antiserum on isolated mast cells under aerobic and anaerobic conditions. *Jap. J. Pharmacol.*, **14** : 375-390 (1964).
- SANYAL, R. K. and G. B. WEST. — Binding of histamine in mammalian tissues. *Nature (London)*, **178** : 1 293 (1956).
- SCHAUER, A. — Die Mastzelle. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1964, 106 p.
- SCHAUER, A. und M. EDER. — Die Entwicklung von Mukopolysacchariden und Bildung histochemisch nachweisbarer Enzyme während der Mastzellreifung. *Virchow's Arch. pathol. Anat.*, **335** : 72-83 (1962).
- SCHAUER, A. und E. WERLE. — Zur histochemische Darstellung des Histamins der Mastzellen. *Z. ges. exp. Med.*, **131** : 100 (1959).
- SCHAYER, R. W. — Formation and binding of histamine by free mast cells of rat peritoneal fluid. *Amer. J. Physiol.*, **186** : 199-202 (1956).
- SCHAYER, R. W. — Induced synthesis of histamine microcirculatory regulation and the mechanism of action of the adrenal glucocorticoid hormones. In : *Progress in allergy*, Vol. VII, Karger ed., Bâle, 1963, p. 187.
- SCHAYER, R. W. — In : RILEY, J. F. — Functional significance of histamine and heparin in tissue mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 151-163 (1963). In : Discussion, p. 161.
- SCHAYER, R. W. and Y. KOBAYASHI. — Histidine decarboxylase and histamine binding in rabbit platelets. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **92** : 653-655 (1956).
- SCHILLER, S. — Mucopolysaccharides of normal mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 199-208 (1963).
- SCHINDLER, R. — The conversion of ^{14}C labelled tryptophan to 5-hydroxytryptamine by neoplastic mast cells. *Biochem. Pharmacol.*, **1** : 323-327 (1958).
- SCHINDLER, R., M. DAY and G. A. FISCHER. — Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine *in vitro*. *Cancer Res.*, **19** : 47-51 (1959).
- SCOTT, J. E. and J. DORLING. — Differential staining of acid glycosamino-glycans mucopolysaccharides by alcian blue in salt solutions. *Histochemie*, **5** : 221-233 (1965).
- SELYE, H. — The mast cells. Butterworth Publ., London, 1965, 498 p.
- SELYE, H., G. GABBIANI and K. NIELSEN. — The « periosteal spread » technic for study of mast cells. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **112** : 460-463 (1963).
- SHORE, P. A., S. L. SILVER and B. B. BRODIE. — Interaction of reserpine, serotonin and lysergic acid diethylamide in brain. *Science*, **122** : 284-285 (1955).
- SHORE, P. A., A. PLETSCHER, E. G. TOMICH, A. CARLSSON, R. KUNTZMAN and B. B. BRODIE. — Role of brain serotonin in reserpine action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66** : 609-617 (1957).
- SIMPSON, W. L. — Distribution of mast cells as a function of age and exposure to carcinogenic agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 4-19 (1963).
- SIMPSON, W. L., Y. HAYASHI and E. PAWLEY. — Mesenchymal and mast cell changes during hydrocarbon carcinogenesis. *Proceedings International Symposium of Biological interactions in normal and neoplastic growth*. Little, Brown and Co. Publ., Boston, 1962.
- SMITH, D. E. — Nature of the secretory activity of the mast cell. *Amer. J. Physiol.*, **193** : 573-575 (1958).
- SMITH, D. E. — Electron microscopy of normal mast cells under various experimental conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103** : Art. 1 : 40-52 (1963a).
- SMITH, D. E. — The tissue mast cell. *Int. Rev. Cytol.*, **14** : 327-386 (1963b).

- SMITH, D. E. and Y. S. LEWIS. — Electron microscopy of the tissue mast cell. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **3** : 9-13 (1957).
- SMITH, D. E., Y. S. LEWIS and G. SVIHLA. — Cinephotomicrography of living mast cells under the influence of pharmacological agents. *Anat. Rec.*, **136** : 359 (1960).
- SPICER, S. S. — A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, **8** : 18-36 (1960).
- STELLA, A. — Sobre los mastzellen de la cucia humana. *An. Fac. Odont. (Montevideo)*, **2** : 125 (1955), in SELYE, H. — The mast cells. Butterworth Publ., London, 1965, p. 95.
- SYLVÉN, B. — The cytoplasm of living tissue mast cells in visual phase-contrast. *Exp. Cell Res.*, **1** : 492-493 (1950).
- THIERY, J. P. — Etude au microscope électronique de la maturation et de l'excrétion des granules des mastocytes. *J. Micr.*, **2** : 549-556 (1963).
- UNNA, P. G. — Histopathologie der Hautkrankheiten (Neurofibrom, Urticaria pigmentosa, Miliaria, Siphilide). Léopold Voss Verlag, Hamburg, 1894.
- UVNÄS, B. — Mechanism of action of a histamine-liberating principle in jellyfish (*Cyanea capillata*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90** : 751-759 (1960).
- UVNÄS, B. — Mechanism of histamine release from mast cells. *Chemotherapia*, **3** : 137-149 (1961).
- UVNÄS, B. — Mechanism of histamine release in mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **103**, Art. 1 : 278-283 (1963).
- UVNÄS, B. and I. L. THON. — Isolation of « biologically intact » mast cells. *Exp. Cell Res.*, **18** : 512-520 (1959).
- UVNÄS, B. and I. L. THON. — Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells. *Exp. Cell Res.*, **23** : 45-57 (1967).
- VALENTINE, W. N., J. S. LAWRENCE, M. L. PEARCE and W. S. BECK. — The relationship of the basophil to blood histamine in man. *Blood*, **10** : 154-159 (1955).
- VAN ARDSEL, P. P. and R. E. BRAY. — On the release of histamine from rat peritoneal mast cells by compound 48/80 : effects of metabolic inhibitors. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **133** : 314-324 (1961).
- VANORDEN, L. S., I. VOGMAN and N. GIARMAN. — 5-hydroxytryptamine in single neoplastic mast cells, a microscopic spectrofluorometric study. *Science*, **148** : 642-644 (1965).
- VELICAN, C. and D. VELICAN. — Genesis of the elements having the appearance of tissular mast cells. *Acta morphol. Acad. Sci. Hungar.*, **9** : 11-34 (1959).
- VELICAN, C. and D. VELICAN. — Histogenesis of mast cells. *Folia histochem. cytochem.*, **1** : 433-446 (1963).
- WALKER, B. E. and W. K. O'STEEN. — Proliferation of mast cells in normal and dystrophic mice. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **113** : 183-185 (1963).
- WALTON, K. W. — Investigation of the toxicity of a serie of dextran sulphates of varying molecular weight. *Brit. J. Pharmacol.*, **9** : 1-14 (1954).
- WATSON, W. C. and J. S. KENNEDY. — Renegeration of the tissue mast cell, an autoradiographic study. *Brit. J. exp. Path.*, **41** : 385-387 (1960).
- WEBB, R. L. — Peritoneal reactions in the white rat, with especial reference to the mast cells. *Amer. J. Anat.*, **49** : 283-334 (1931).
- WEBB, R. L. — Numerical changes of mast cells within the dermis of the white rat. *Anat. Rec.*, **64**, Suppl. : **122** : 55 (1935).
- WEIDENREICH, F. — Zur Kenntnis der Zellen mit basophilen Granulationen im Blut und Bindegewebe. *Folia haemat. (Leipzig)*, **5** : 135-155 (1908).
- WEISS, M., L. AIME et M. GUERREZ. — Sur un nouveau procédé de dosage et de titration de l'héparine dans le plasma. *Rev. franç. Etudes clin. biol.*, **4** : 726 (1959).
- WELSH, R. A. and J. C. GEER. — Phagocytosis of mast cells granule by the eosinophilic leucocyte in the rat. *Amer. J. Path.*, **35** : 103-111 (1959).
- WERLE, E. and R. AMANN. — Zur Physiologie der Mastzellen als Träger des Heparins und Histamins. *Klin. Wschr.*, **34** : 624-630 (1956).
- WERLE, E. and W. LORENZ. — Histamin und Histidindecaboxylasen in Schilddrüse und Thymus. *Biochem. Pharmacol.*, **15** : 1 059-1 070 (1966).
- WEST, G. B. — Pharmacology of the tissue mast cell. *Brit. J. Dermat.*, **70** : 409-417 (1958).

- WEST, G. B. — Function of mast cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **14** : 618-619 (1962).
- WILLIAMS, W., E. LARSSON and T. L. PHILLIPS. — A neoplastic connective tissue mast cell capable of continuous growth in tissue culture. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **6** : 361-368 (1959).
- WINOCOUR, E. and L. SACHS. — A plaque assay for the polyoma virus. *Virology*, **8** : 397-400 (1959).
- WINOCOUR, E. and L. SACHS. — Cell-virus interactions with the polyoma virus. I. Studies on the lytic interaction in the mouse embryo system. *Virology*, **11** : 699-721 (1960).
- WISLOCKY, G. B. and E. W. DEMPSEY. — Observations on the chemical cytology of normal blood and hemopoietic tissues. *Anat. Rec.*, **96** : 249-270 (1946).
- WORTHINGTON, W. C. and N. C. BAILEY. — Dual staining of mast cell cytoplasmic constituents by alcian blue and safranin. *J. Histochem. Cytochem.*, **10** : 503 (1962).
- YAMURA, T. and N. WATANABE. — Histamine release from isolated rat mast cells by adding plasmin. *Acta med. (Nagasaki)*, **5** : 142 (1961).
- ZITCER, E. M. and P. L. KIRK. — The effect of serum ultrafiltrate on cultivated mast cells and fibroblasts from human skin. *Science*, **119** : 99 (1954).
- ZOLLINGER, H. U. — Gewebemastzellen und Heparin (phasenmikroskopische Untersuchungen). *Experientia*, **6** : 384-386 (1950).
- ZWILLENBERG, L. O. — The dendritic cell system and mast cells in non epidermal stratified squamous epithelium. *Nature (London)*, **181** : 1 343-1 344 (1958).

D 1968/0480/42

